

Avaliação do espectro de reação de um sistema de diagnóstico por vídeo rastreio de Peixes Zebra (*Danio rerio*) expostos a cinco tóxicos distintos.

JOÃO ANTÓNIO SILVA AMORIM

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO APRESENTADA

AO INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS ABEL SALAZAR

DA UNIVERSIDADE DO PORTO EM

TOXICOLOGIA E CONTAMINAÇÃO AMBIENTAIS

João António Silva Amorim

Avaliação do espectro de reação de um sistema de diagnóstico por vídeo rastreio de Peixes Zebra (*Danio rerio*) expostos a cinco tóxicos distintos.

Dissertação de Candidatura ao grau de Mestre em Toxicologia e Contaminação Ambientais submetida ao Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar da Universidade do Porto.

Orientador - Doutor Luis Filipe Pereira de Oliva Teles.

Categoria - Professor e Investigador Auxiliar.

Afiliação - Faculdade de Ciências da Universidade do Porto e Centro Interdisciplinar de Investigação Marinha e Ambiental.

Agradecimentos

A realização deste trabalho não teria sido possível sem a ajuda e o envolvimento de inúmeras pessoas que foram imprescindíveis ao longo de mais de dois anos.

Gostaria de começar por agradecer ao meu orientador, Professor Luis Filipe Teles, por todo o conhecimento e empenho que sempre demonstrou. O seu apoio foi um dos pilares que tornou possível a criação desta tese. A sua boa disposição e capacidade de trabalho foram apenas algumas das inúmeras virtudes que demonstrou e que o caracterizam enquanto Investigador e Professor. A ele deixo o meu muito obrigado.

A todos os meus colegas de Mestrado, com os quais passei inúmeras horas de estudo e convivência, momentos que nunca esquecerei e que guardarei como dos melhores da minha vida. Por vezes com etapas difíceis, com muito trabalho e cansaço, mas que no fim acabaram por compensar e deixar todos orgulhosos. A eles deixo os meus votos de muitas felicidades e sucesso.

Um obrigado muito especial aos meus colegas e grandes amigos Joana Machado, Miguel Fernandes e Tiago Afonso, sem os quais nunca teria conseguido alcançar os meus objetivos. Estiveram sempre presentes e dispostos a ajudar. Demonstraram imensa paciência e humildade do primeiro ao último segundo. A eles deixo estas palavras, que apesar de insuficientes, são verdadeiras.

A todos os Professores e Investigadores que ao longo do Mestrado me apoiaram e transmitiram os seus conhecimentos. Com os quais tive o prazer de trabalhar e conviver em três grandes casas, cujos nomes não devem deixar de ser referidos, nomeadamente: a Faculdade de Ciências da Universidade do Porto, o Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar da Universidade do Porto e o Centro Interdisciplinar de Investigação Marinha e Ambiental.

Ao Professor Doutor Vitor Vasconcelos, gostaria de deixar o meu profundo agradecimento por ter tornado possível a realização desta tese e por ter sempre apoiado o meu trabalho.

Aos meus amigos que me acompanharam desde sempre, cuja amizade de longos anos nunca se apagará da minha memória. Um especial muito obrigado para a Filipa Almeida, Frederico Maia, Pedro Leite e Tiago Correia.

Por fim, gostaria de agradecer aos meus pais, sem os quais não seria possível escrever estas palavras. Sem os quais não seria a pessoa que sou hoje. Sempre me deram todas as oportunidades e liberdades para seguir o caminho que me trouxe até este momento. Gostaria de lhes dedicar o meu trabalho e de dizer que nada que possa escrever irá algum dia ser capaz de descrever a minha gratidão e amor.

Abstract

Objectives: The main objective of this work was to create and test an automated alert system of disturbances of the aquatic environment and confront it with five different toxics with distinct chemical nature, in order to confirm the potential broad spectrum of action, using only the analysis of behavior of Zebra Fish (*Danio rerio*). The study involved the construction of a video tracking system that would confirm the quality of the tested water in an easy and reliable way, without the need of any kind of biochemical test.

Methodology: Three identical video tracking systems were built that through the capture of video and the analysis of nine behavioral components of the fish allowed to infer the presence or absence of contamination in the water. Six experimental conditions were tested: one negative control and five toxics of different chemical nature, namely: Bleach, Lindane, Tributyltin, Mercury and Formaldehyde. There were two replicates for experimental condition and the assay was repeated nine times for statistical validation of the results. The exposure time was set at one hour and the concentration used corresponded to 9% of the LC₅₀-96h of the tested compounds, in order to put to the test the capability of the system and get environmental relevant results.

An Artificial Neural Network of the type Self-Organizing Map was used in conjunction with a Correspondence Analysis for the construction of a statistical model of diagnostic and obtaining values of accuracy, sensibility, specificity, false positives, false negatives, positive predictive value and negative predictive value.

Results: The system had an overall diagnostic capability of 79% in accuracy, 77% in sensitivity and 88% in specificity. The lowest result of the predictive value was 78% (Lindane and Mercury), in the case of the negative predictive value, and 86% (Bleach and Lindane), in the case of the positive predictive value. The best result of the predictive value was 100% (Bleach and TBT), in the case of the negative predictive value, and 89% (TBT), in the case of the positive predictive value. Even though it was not the main objective of the study, it was possible to analyze which behavioral factors were most affected by the presence of the contaminants.

Conclusion: The novel video tracking system built was able to produce a great number of diagnoses, in a short period of time and with a high quality, even in the presence of different types of contaminants.

Resumo

Objetivos: O principal objetivo deste trabalho foi o de criar e testar um sistema automático de alerta de perturbações do meio aquático e confrontá-lo com cinco tóxicos de natureza química distinta, de forma a confirmar o seu potencial espectro de ação, recorrendo apenas à análise do comportamento do Peixe Zebra (*Danio rerio*). O estudo envolveu a construção de um sistema de vídeo rastreio capaz de comprovar de forma rápida e fiável a qualidade da água, sem utilização de qualquer tipo de testes bioquímicos.

Metodologia: Foram construídos três sistemas de vídeo rastreio idênticos que através da captura de vídeo e análise de nove componentes do comportamento dos peixes permitiram inferir sobre a presença ou ausência de contaminação na água. Foram testadas seis condições experimentais: um controlo negativo e cinco tóxicos de natureza química distinta, nomeadamente: Lixívia, Lindano, Tributilestanho, Mercúrio e Formaldeído. Existiram duas réplicas por condição experimental e o ensaio foi repetido nove vezes de forma a permitir validação estatística dos resultados. O tempo de exposição estabelecido foi de uma hora e a concentração utilizada correspondeu a 9% do CL₅₀-96h dos compostos testados, para permitir pôr à prova a capacidade do sistema e obter resultados ecologicamente relevantes.

Foi utilizada uma Rede Neuronal Artificial do tipo *Self-Organizing Map* em conjunto com uma Análise de Correspondência para construção de um modelo estatístico de diagnóstico e obtenção de valores de exatidão, sensibilidade, especificidade, falsos positivos, falsos negativos, valor preditivo positivo e valor preditivo negativo.

Resultados: O sistema apresentou uma capacidade geral de diagnóstico de 79% de exatidão, 77% de sensibilidade e 88% de especificidade. O menor resultado de capacidade preditiva foi de 78% (Lindano e Mercúrio), no caso do valor preditivo negativo, e 86% (Lindano e Lixívia), no caso do valor preditivo positivo. O melhor resultado da capacidade preditiva foi de 100% (Lixívia e TBE), no caso do valor preditivo negativo, e 89% (TBE), no caso do valor preditivo positivo. Apesar de não constituir o objetivo principal do estudo, foi possível analisar quais os fatores comportamentais mais afetados pela presença dos contaminantes.

Conclusão: O sistema de vídeo rastreio construído de raiz mostrou, mesmo na presença de diferentes tipos de contaminantes, ser capaz de produzir um grande número de diagnósticos, num curto espaço de tempo e com uma elevada qualidade.

Índice

1.	Introdução	1
1.1.	Ambientes Aquáticos	1
1.2.	Perigos Toxicológicos	2
1.3.	Avaliação do Risco Ecológico	3
1.4.	Ecotoxicologia	4
1.5.	Comportamento como Indicador de Toxicidade	6
1.6.	Redes Neurais Artificiais na Compreensão do Comportamento Animal ..	7
1.7.	Vídeo Rastreo como Sistema Automático de Alerta Precoce de Perturbações do Meio Aquático	9
1.8.	Peixe Zebra como Modelo	10
1.9.	Os Tóxicos	11
1.9.1.	Lixívia – NaClO	11
1.9.2.	Lindano - Gama-Hexaclorocicloexano (γ -HCH)	12
1.9.3.	Tributilestanho (TBE)	14
1.9.4.	Mercúrio	16
1.9.5.	Formaldeído	18
1.10.	Objetivos do Trabalho	20
2.	Material e Métodos	21
2.1.	Preparação do Material	19
2.2.	Aquisição dos Animais	23
2.3.	Escolha dos Tóxicos	23
2.4.	Ensaio Definitivo	25
2.5.	Tratamento de Imagem	27
2.6.	Análise Estatística	30
3.	Resultados	32
3.1.	ANOVA e Grupos Homogêneos	32
3.2.	<i>Cluster Analysis</i>	34
3.3.	Análise de Correspondência	37
4.	Discussão	43
5.	Conclusão	50
6.	Referências Bibliográficas	51
7.	Anexos	60

Índice de figuras

Figura 1 - Disposição esquemática do sistema de filmagem: A - cortiça expandida; B - espuma rígida de poliestireno; C - câmara 540L IR; D - banho-maria; E – vidro transparente; F - iluminação.	22
Figura 2 - Disposição esquemática dos banhos-maria (vista superior): 1 - banho-maria; 2 - bomba de filtragem de água Tetra GmbH D-49304; 3 - resistência elétrica TetraTec HT50; 4 - arenas de filmagem (condições experimentais A, B, C e D).	22
Figura 3 - Exemplo da aplicação do filtro de fundo claro (<i>light background filter</i>) e ferramenta de <i>Rolling Ball Background</i> no programa <i>ImageJ</i>	28
Figura 4 - Exemplo da utilização da ferramenta de seleção poligonal no programa <i>ImageJ</i>	28
Figura 5 - Exemplo da aplicação da ferramenta de alteração de <i>Threshold</i> no programa de <i>ImageJ</i>	29
Figura 6 - <i>Statistica Weights Spreadsheet</i> : Resumo da importância de cada uma das variáveis (coordenada X, coordenada Y, velocidade linear, aceleração linear, ângulo entre os segmentos formados pelas coordenadas do peixe em três frames sucessivos, velocidade angular, aceleração angular, <i>meander</i> absoluto e dispersão) na definição das nove categorias criadas pela <i>Cluster Analysis</i>	36
Figura 7 - <i>Statistica Standardized Deviates</i> : Resumo do desvio da frequência entre os valores observados e valores esperados, em cada uma das condições experimentais, nomeadamente: Controlo (Sem), Lixívia (lix), Lindano (Lin), TBE, Mercúrio (Hg) e Formol (For).	37

Índice de Tabelas

Tabela 1 - Resumo das concentrações utilizadas e valores de CL ₅₀ -96h que estiveram na sua origem, para os compostos Hipoclorito de Sódio, Lindano, TBE, Cloreto de Mercúrio e Formol.	25
Tabela 2 - Valores médios e desvios-padrão das variáveis coordenada X (mm) e coordenada Y (mm), nas condições experimentais Controlo, Lixívia, Lindano, TBE, Mercúrio e Formol. Os valores médios a vermelho são significativamente inferiores aos registados no controlo, os valores médios a verde são significativamente superiores aos registados no controlo ($\alpha < 0,05$).	32
Tabela 3 - Valores médios e desvios-padrão das variáveis velocidade linear (mm/s) e velocidade angular (graus/s), nas condições experimentais Controlo, Lixívia, Lindano, TBE, Mercúrio e Formol. Os valores médios a vermelho são significativamente inferiores aos registados no controlo, os valores médios a verde são significativamente superiores aos registados no controlo ($\alpha < 0,05$).	33
Tabela 4 - Valores médios e desvios-padrão das variáveis aceleração linear (mm/s ²) e aceleração angular (graus/s ²), nas condições experimentais Controlo, Lixívia, Lindano, TBE, Mercúrio e Formol. Os valores médios a vermelho são significativamente inferiores aos registados no controlo, os valores médios a verde são significativamente superiores aos registados no controlo ($\alpha < 0,05$).	33
Tabela 5 - Valores médios e desvios-padrão das variáveis dispersão (raiz quadrada do produto dos desvios padrão X Y), ângulo entre os segmentos formados pelas coordenadas do peixe em três frames sucessivos e <i>meander</i> absoluto nas condições experimentais Controlo, Lixívia, Lindano, TBE, Mercúrio e Formol. Os valores médios a vermelho são significativamente inferiores aos registados no controlo, os valores médios a verde são significativamente superiores aos registados no controlo ($\alpha < 0,05$).	34
Tabela 6 - <i>Statistica Error Test</i> : Teste ao erro de cada uma das séries temporais criadas pela <i>Cluster</i> , nomeadamente a série Treino, Teste e Validação.	35
Tabela 7 – <i>Statistica Eigenvalues and Inertia for all Dimensions</i> : Valores próprios e estatísticas relacionadas.	38

Tabela 8 – Resultados dos diagnósticos: Número de diagnósticos verdadeiro positivo, verdadeiro negativo, falso positivo, falso negativo e incerto, por condição experimental, nomeadamente: Lixívia, Lindano, TBE, Mercúrio e Formol. Os valores apresentados encontram-se em valores absolutos. 40

Tabela 9 – Resultados da qualidade do diagnóstico: Valores de exatidão, sensibilidade, especificidade, VPP e VPN por condição experimental, nomeadamente: Lixívia, Lindano, TBE, Mercúrio e Formol. Os valores apresentados encontram-se em unidades percentuais. 41

Tabela 10 – Resultados da identificação dada pelas medidas das distâncias escalares, por condição experimental, nomeadamente: Lixívia, Lindano, TBE, Mercúrio e Formol. Os valores apresentados são valores absolutos. 41

Lista de Abreviaturas

CL₅₀ - Concentração letal 50. Concentração do composto que é letal para 50% dos organismos testados.

EROs - Espécies reativas de oxigénios.

FBC - Fator de Bioacumulação.

HCH - Hexaclorocicloexano.

LOEC (*Lowest Observed Effect Concentration*) - Concentração mínima do composto responsável pelo aparecimento de efeitos observáveis nos organismos testados.

NOEC (*No Observed Effect Concentration*) - Concentração máxima do composto para a qual não existem efeitos observáveis nos organismos testados.

OMS - Organização Mundial de Saúde.

POP - Poluente Orgânico Persistente.

SOM - *Self-Organizing Map*.

VIH - Vírus da imunodeficiência humana adquirida.

1. Introdução

1.1. Ambientes Aquáticos

A preservação da água e dos ambientes aquáticos é, presentemente, uma das grandes preocupações a nível global. A sua importância é apenas comparável à sua dimensão: cerca de 0,02% da massa total do planeta, 3/4 da sua superfície e a 1,3 mil milhões de quilómetros cúbicos (Shiklomanov, 1998).

Os oceanos constituem a maior parcela da massa de água do planeta (97%), ocupando 71% da superfície terrestre e apresentando uma espessura média de cerca de 4 quilómetros. Uma das características destes ambientes é a sua considerável quantidade de sais dissolvidos, principalmente Cloreto de Sódio, com uma concentração média de 34 gramas por litro que, no entanto, pode variar consideravelmente de acordo com as características de cada local. A temperatura, luz e profundidade são também fatores que podem variar de forma drástica influenciando, por exemplo, a diversidade das espécies presentes. Os oceanos são extremamente importantes na regulação da dinâmica do planeta por possuírem uma enorme capacidade térmica que permite o armazenamento de grandes quantidades de energia solar, essenciais à regulação do clima e dos ventos a nível global. A evaporação nos oceanos, como parte do Ciclo da Água, é a principal fonte de precipitação, sendo ainda parte integrante do Ciclo do Carbono (Talley *et al.*, 2011). A sua importância é inegável, não só pelo facto de ser considerado o berço e o suporte para o desenvolvimento das primeiras formas de vida na Terra (há pelo menos 3,5 mil milhões de anos) (Kasting, 1993) como também por ser habitat de mais de 220.000 espécies eucariotas conhecidas e descritas, sendo que o número de espécies por descobrir pode aproximar-se das 750.000 (Appeltans *et al.*, 2012). Este número, por si só, permite demonstrar o quão diminuto é o conhecimento acerca destes ambientes, deveras complexos e dinâmicos. Para o Homem, os oceanos são não só essenciais à vida como também uma importante mais-valia económica, representando uma fonte (finita) de recursos para a indústria pesqueira e outras, bem como uma via aberta ao transporte de mercadorias entre os diferentes continentes (Costanza, 1999).

Apenas 3% da água na Terra é doce, sendo que desta cerca de 98,8% encontra-se retida em calotes polares ou lençóis freáticos. A restante parcela encontra-se presente em rios, lagos, atmosfera, corpos biológicos ou produtos manufaturados, sendo que apenas 0,01% está disponível para uso direto por parte do Homem (Azizullah *et al.*, 2011). Esta percentagem tão reduzida é causa de grande preocupação porque, historicamente,

as civilizações sempre floresceram perto de grandes massas de água doce, devendo o seu sucesso (ou parte dele) à acessibilidade e disponibilidade deste recurso, sendo que em zonas onde o seu acesso é limitado a necessidade e escassez de água representa um dos maiores fatores limitantes ao desenvolvimento humano (Kusangaya *et al.*, 2014).

A água é não só um bem essencial ao Homem e às suas atividades como também a qualquer organismo vivo, sendo do ponto de vista biológico um elemento fulcral em processos vitais como o metabolismo, a fotossíntese, as funções enzimáticas, a destoxificação, a regulação da temperatura interna e a replicação celular, que permitem o desenvolvimento e manutenção da homeostasia interna (Chaplin, 2001).

1.2. Perigos Toxicológicos

Apesar da importância inquestionável da água e dos inúmeros ambientes que dela dependem, a complexidade dos mesmos torna difícil a sua preservação aquando da existência de pressões exercidas pelo Homem. A sobre-exploração de recursos (pela indústria pesqueira), a alteração das propriedades térmicas da água (arrefecimento de máquinas na indústria), a modificação das características hidrográficas de uma região (construção de pontes ou barragens), entre outros, pode levar à deterioração irreversível dos ambientes aquáticos. No entanto, todos estes são exemplos de modificações a uma escala macroscópica, ou seja, a uma dimensão considerável e de certa forma de mais fácil compreensão e visibilidade. De um ponto de vista ecotoxicológico as preocupações devem surgir muito antes de qualquer modificação significativa, de forma a evitar situações limite e custos ainda maiores, tanto para o Homem como para o Ambiente (van der Oost *et al.*, 2003).

Um dos fenómenos mais frequentes e de mais difícil controlo é a contaminação dos corpos de água por poluentes, direta ou indiretamente introduzidos nestes ambientes pelo Homem sem o devido tratamento, afetando não só os organismos e espécies individualmente como também as comunidades biológicas e as interações entre as mesmas, levando assim a uma perturbação à escala do ecossistema (LeBlanc, 1994). É um problema que requer um esforço de avaliação e monitorização contínuo, a todos os níveis, desde os grandes oceanos aos pequenos ribeiros. Para além de tudo isto, as fontes de poluição podem ainda ser bastante variadas e de difícil caracterização, podendo ser diferenciadas em duas grandes categorias: fontes pontuais, uma única causa identificável, como um efluente de uma ETAR; e fontes difusas, em que a contaminação não é proveniente de uma fonte isolada, como o lixiviamento de pesticidas num campo agrícola

(Wu e Chen, 2013). Estas fontes podem não ser visíveis nem se encontrarem à superfície, tal como quando ocorre contaminação de aquíferos por parte de algo tão comum como uma fossa séptica.

É ainda preciso considerar que raramente ocorre uma contaminação isolada, de um ponto específico e bem caracterizado, onde existe unicamente um contaminante e em que os efeitos são detetados precocemente. O que na grande maioria das ocasiões ocorre é uma interação de tóxicos, provenientes de uma fonte ou fontes desconhecidas, com efeitos que não refletem os causados pelos mesmos compostos, quando isolados (Ensenbach e Nagel, 1995).

1.3. Avaliação do Risco Ecológico

A avaliação do risco ecológico é o processo que avalia a probabilidade do Meio Ambiente sofrer impactos negativos, em resultado da exposição a um ou mais agentes nocivos, como compostos químicos, doenças, espécies invasores e/ou mudanças climáticas. Algumas das preocupações mais visíveis e mediáticas ocorrem quando existem potenciais riscos estéticos, por alterações físicas nas paisagens; efeitos evidentes da poluição em espécies protegidas ou consequências de longo prazo em ecossistemas contaminados. Um aspeto importante da avaliação do risco ecológico é a compreensão dos possíveis efeitos negativos de perturbações ambientais e os seus potenciais riscos, de forma a proteger os ambientes, os recursos naturais e o Homem. A avaliação do risco inclui três fases essenciais: a formulação do problema, de forma a determinar o que está em risco e o que precisa de ser protegido; a análise do problema, de forma a determinar níveis de exposição e potenciais efeitos ecológicos negativos; a caracterização do risco, de forma a avaliar os efeitos negativos e interpretar os riscos deles resultantes (EPA, 1998).

De uma forma geral a monitorização e a avaliação do risco pode ser conduzida segundo três tipos de métodos: químicos, físicos e biológicos. Em primeiro lugar, os métodos químicos, que compreendem todas as análises que envolvem química analítica, tais como, deteção ou quantificação de compostos ou determinação de certos parâmetros como pH. Em segundo lugar, os métodos físicos, que compreendem a determinação de parâmetros como a temperatura, concentração de sólidos em suspensão ou turbidez. E por fim, os métodos biológicos, que envolvem o uso de plantas, animais ou microrganismos que podem ser usados como indicadores, através dos quais é possível perceber os efeitos específicos de um dado contaminante ou inferir acerca do estado ou integridade de um ecossistema. Muitos são seleccionados pela sua grande sensibilidade, sendo os primeiros

seres a sofrer repercussões após a destabilização da dinâmica do seu habitat (Lazorchak e Josephs, 2003).

No entanto, a utilização destes indicadores não se encontra limitada às populações autóctones, sendo que outros organismos não representativos de um ambiente específico podem ser escolhidos, quando por exemplo, é necessário determinar valores dos *endpoints* típicos usados em Ecotoxicologia como CL₅₀ (concentração letal para 50% dos organismos testados), NOEC (*No Observed Effect Concentration* - concentração máxima para a qual não existem efeitos observáveis nos organismos testados) ou LOEC (*Lowest Observed Effect Concentration* - concentração mínima responsável pelo aparecimento de efeitos observáveis nos organismos testados). A escolha destes organismos deve-se ao facto de serem de mais fácil manutenção em laboratório, serem exaustivamente estudados e bem caracterizados, apresentarem maior facilidade de comparação de resultados e maior fiabilidade na determinação de fatores de segurança entre diferentes espécies. Estes são denominados organismos modelo (Ankeny e Leonelli, 2011).

1.4. Ecotoxicologia

A Ecotoxicologia é um campo multidisciplinar que integra conhecimentos de duas grandes áreas de estudo: a Toxicologia e a Ecologia. A Toxicologia procura compreender os efeitos adversos que determinados agentes podem ter nos organismos vivos, agentes frequentemente categorizados como tóxicos, mas que podem ser bastante diferentes entre si, incluindo na sua origem. Permite-nos estudar a ação tóxica dos diferentes compostos, percebendo assim os mecanismos de ação dos mesmos, os efeitos negativos e os tratamentos que estes possam ter, bem como ajudar na deteção e mitigação dos problemas deles resultantes. A Ecologia procura compreender as interações que ocorrem entre os organismos e o ambiente que os rodeia, no sentido de perceber a dinâmica entre as componentes bióticas e abióticas de um dado ecossistema. A sua dimensão é gigantesca quando considerados os diferentes níveis organizacionais que podemos encontrar dentro de um único ambiente, desde o nível microscópico até à escala global, toda a biosfera. Atualmente é um campo de estudo cuja principal visão se centra na sustentabilidade do planeta. A Ecotoxicologia procura não só compreender os efeitos adversos de determinados agentes em organismos vivos, como também relacioná-los com os diferentes níveis de organização dentro do mesmo ecossistema. Os seus principais objetivos são a prevenção dos problemas ambientais causados por tóxicos e em segundo lugar a resolução dos mesmos (Forbes e Forbes, 1994).

Um dos grandes problemas enfrentados pela Ecotoxicologia é a disparidade entre o ritmo de desenvolvimento e descoberta de novos compostos e a avaliação do seu potencial risco, tanto para o Homem como para o Ambiente (Bushnell *et al.*, 2010). Apesar do esforço conjunto entre vários países e organizações ambientais, de forma a desenvolver ensaios toxicológicos baseados na ecologia e integrando diferentes visões, como a caracterização química dos compostos e o seu reflexo nos fatores biológicos como a diversidade, os *endpoints* toxicológicos tradicionais (mortalidade, NOEC, LOEC, entre outros) continuam a ser exaustivamente utilizados, muito embora possam avaliar apenas aspetos pontuais (Clotfelter *et al.*, 2004). Tratam-se de valores relativamente simples de obter e comparar entre si, dado que existe uma grande variedade de ensaios padronizados utilizando organismos modelo, mas que podem apresentar enormes disparidades de resultados entre diferentes espécies, ou até dentro de uma mesma espécie, quando comparamos resultados obtidos por autores distintos. Podem ter uma importância ecológica pouco significativa uma vez que, idealmente, as ferramentas de avaliação de risco devem promover a sustentabilidade dos ecossistemas identificando precocemente os sintomas de exposição a tóxicos (Bouvier d'Yvoire *et al.*, 2012).

Os resultados de testes toxicológicos pontuais (agudos) podem ser suplementados por ensaios ao longo de um período de tempo mais abrangente, geralmente superior a 90 dias ou relativo a mais do que uma geração, denominados ensaios sub-crónicos ou crónicos. Nestes, podem ser observados efeitos ao nível do indivíduo, como o crescimento, mas ainda efeitos ao nível populacional, como o sucesso de reprodução. São geralmente reservados a estudos sobre a carcinogenicidade, mutagenicidade e toxicocinética de compostos (Barile, 2013).

Muitos destes ensaios, quer agudos quer crónicos, utilizam concentrações com baixa relevância ecológica, por não corresponderem a níveis realistas de contaminação ambiental, sendo geralmente muito mais elevadas que as registadas em situações reais (Bouvier d'Yvoire *et al.*, 2012). Mesmo quando fortemente contaminados, os ecossistemas naturais podem apresentar concentrações muito inferiores às letais para a maioria das espécies, capazes de provocar efeitos profundos, mas não a morte de organismos (Cabrera *et al.*, 1998). Estes efeitos, apesar de insuficientes para causar mortalidade relevante, podem levar a perda de funções ecológicas, dado que o comportamento normal das espécies afetadas pode ser alterado (Scott *et al.*, 2003). Estas modificações de comportamento podem afetar a capacidade predatória ou de fuga a predadores, a capacidade sensorial, os comportamentos sociais, os padrões migratórios, alterar ritmos circadianos, entre outros (Little e Finger, 1990).

1.5. Comportamento como Indicador de Toxicidade

Como ferramenta para a Ecotoxicologia, o comportamento animal tem vindo a ganhar uma importância crescente, muito devido ao facto de apresentar uma sensibilidade até 1.000 vezes superior ao convencional, e exaustivamente utilizado, valor de CL_{50} (Hellou, 2011). O comportamento é um efeito a nível individual de um dado organismo e é definido pela ação ou reação a um determinado conjunto de circunstâncias, tanto a nível molecular, físico e/ou ecológico (Scott e Sloman, 2004). Resulta das condições a que um organismo está sujeito e representa um efeito agudo e/ou cumulativo. Representa ainda uma interface única entre fatores intrínsecos e extrínsecos, que determinam a sobrevivência de um organismo (Little et al., 1990). Inúmeros parâmetros comportamentais podem ser utilizados como *endpoints* toxicológicos, por serem facilmente observados e quantificados, tais como: respostas de medo/fuga; aspetos relacionados com a capacidade de locomoção, reprodução ou alimentação; agressividade; memória; entre outros. Alterações comportamentais podem ocorrer a concentrações significativamente inferiores às necessárias para causar efeitos fisiológicos evidentes (Faucher et al., 2008), mas capazes de alterar significativamente o comportamento normal das espécies. Alguns exemplos de compostos com este potencial incluem: etinil estradiol, presente nas pílulas anticoncecionais e comum em águas residuais, com capacidade de diminuir a agressividade em diversos organismos; metais pesados, capazes de provocar o aumento dos custos metabólicos, afetando negativamente o balanço energético e levando a um aumento de comportamentos associados à predação (aumento da voracidade), ou ainda pesticidas, que afetam negativamente a capacidade de orientação e navegação (Montiglio e Royauté, 2014). A alteração dos comportamentos normais dos organismos pode ter implicações ecológicas relevantes, dado que afeta a sua capacidade de sobrevivência, desenvolvimento e/ou reprodução. Atualmente, a ubiquidade de muitos contaminantes antropogénicos pode ser responsável por uma mudança na pressão seletiva sobre as espécies presentes em diversos ambientes, devido aos profundos efeitos diretos e indiretos causados pela contaminação dos ecossistemas (Fleeger et al., 2003).

Apesar de inúmeros exemplos poderem ser referidos, um dos mais mediáticos é, possivelmente, o caso do efeito negativo do pesticida DDT na população de Águias-Reais (*Haliaeetus leucocephalus*) da Flórida. Durante os anos de 1950, foi registada uma redução significativa do número de indivíduos desta espécie, que coincidia com o comportamento anormal que as mesmas apresentavam, principalmente no que diz respeito à sua capacidade reprodutiva, mais especificamente durante a corte e a nidificação. Estes comportamentos alertaram para a capacidade de disrupção endócrina deste composto, que só foi finalmente reconhecida durante as décadas de 1980-1990 (Zala e Penn, 2004).

Uma das principais críticas à utilização do comportamento como *endpoint* em ensaios toxicológicos prende-se com o facto de este nem sempre ser uma variável simples de analisar e principalmente por nem sempre ser fácil de comparar entre diferentes estudos (Clotfelter *et al.*, 2004). No entanto, o recente desenvolvimento tecnológico, nomeadamente nas áreas audiovisuais e da informática, permitiu a emergência de sistemas automáticos que possibilitam a análise comportamental de inúmeros organismos distintos, sem necessidade de recorrer a um observador externo que mesmo treinado pode cometer erros ou influenciar intencionalmente (ou não) os resultados finais. É importante perceber que, uma das principais dificuldades encontradas neste tipo de trabalhos e metodologias é o facto de poder existir uma enorme variação intraespecífica, isto é, variações entre indivíduos da mesma espécie e até de uma mesma população, o que significa que quando sujeitos a condições de *stress* semelhantes os comportamentos podem ser relativamente distintos de indivíduo para indivíduo (Schrandt *et al.*, 2012). Apesar disso, um número de réplicas suficientemente elevado e a escolha acertada dos parâmetros a estudar, torna possível a validação estatística dos resultados obtidos. A utilização de métodos de deteção automáticos e o uso de fórmulas matemáticas na descrição dos parâmetros a avaliar, abrem portas a uma possível padronização dos métodos. Este aspeto poderá levar a uma maior difusão destas técnicas, podendo inclusive, num futuro bastante próximo, serem utilizadas na criação de mais e melhor legislação ambiental bem como na criação de sistemas de alerta precoce de perturbações do meio aquático.

1.6. Redes Neurais Artificiais na Compreensão do Comportamento Animal

As redes neuronais artificiais são modelos computacionais de inteligência artificial inspirados no sistema nervoso central animal, particularmente no cérebro. São utilizadas para estimar funções matemáticas não-lineares que dependem de um número elevado de *inputs* (dados de entrada) (Cheng e Titterington, 1994). São geralmente sistemas que apresentam unidades de processamento simples, os “neurónios”, interligados e capazes de relacionar *inputs* e reconhecer padrões nos dados, através do raciocínio indutivo e natureza adaptativa. Estes “neurónios” são nódulos de informação ligados e relacionados entre si, formando uma rede que tenta imitar a organização biológica do cérebro animal. Esta semelhança deve-se à capacidade destes sistemas funcionarem de forma coletiva e em paralelo, sem uma divisão clara de tarefas entre as diferentes unidades. O desenvolvimento das redes neuronais artificiais levou a uma mudança no paradigma da inteligência artificial, passando de sistemas em que o conhecimento se encontrava

presente no seu código, e definido claramente por um conjunto de regras, para um sistema dinâmico, onde a aprendizagem e capacidade de adaptação se destacam. São utilizadas quando existe um conhecimento *a priori* limitado para o problema em questão, sendo capazes de encontrar relações subtis nos dados, mesmo quando estas mesmas relações são difíceis de prever ou até completamente desconhecidas. Por esse motivo são utilizadas quando as soluções requerem um conhecimento que é difícil de explicar, mas para o qual existe um número suficiente de dados/observações. São geralmente mais flexíveis do que métodos estatísticos tradicionais e capazes de melhorar o seu desempenho de forma gradual com a aprendizagem (Zhang *et al.*, 1997). Esta capacidade deve-se ao facto de os pesos associados aos diferentes “neurónios” ser ajustado durante o processo, o que se pode refletir em importâncias diferentes atribuídas a diferentes dados. A sua utilização como método de previsão de resultados data dos anos de 1960, no entanto o desenvolvimento informático e aumento dos recursos computacionais foi essencial para a sua reintrodução durante a década de 1980 (Rumelhart *et al.*, 1986).

A sua utilização no estudo e compreensão do comportamento animal pode tornar-se uma poderosa ferramenta na prevenção de certos tipos de poluição, nomeadamente a aquática, uma vez que pode permitir perceber e classificar comportamentos complexos, que de outra forma não seriam valorizados ou compreendidos.

A Rede Neuronal Artificial do tipo *Self-Organizing Map* (SOM) é um algoritmo que permite mapear informação densa e complexa num espaço bidimensional, através de processos de aprendizagem não supervisionados. Este tipo de aprendizagem não exige um agente externo (investigador) a acompanhar o processo, uma vez que apenas é necessário fornecer à rede os *inputs*. A partir destes dados de entrada a rede deteta as suas semelhanças e tenta estabelecer relações progressivamente mais complexas, que são depois classificadas automaticamente. Neste processo é necessária redundância nos dados de entrada, de forma a ser possível detetar os padrões nos *inputs*. A SOM diferencia-se dos restantes algoritmos uma vez que privilegia a preservação topológica dos dados, o que significa que *inputs* próximos espacialmente são classificados como semelhantes e a importância desta relação é mantida, preservando desta forma as propriedades espaciais do universo de resultados. Esta análise é particularmente eficaz na classificação e deteção de subgrupos relevantes nos dados (*Clusters*), especialmente quando não existe qualquer conhecimento sobre os mesmos. As relações dentro de um mesmo Cluster deverão ser semelhantes, não o sendo no caso de outros subgrupos (homologia interna e separação externa) (Qiao e Han, 2010; Cabanes e Bennani, 2010).

Em suma, a capacidade deste algoritmo em generalizar, aprender com a experiência e preservar a organização topológica dos dados torna-o ideal como ferramenta de diagnóstico, uma vez que não necessita de conhecimento *a priori* sobre as condições testadas, apresenta capacidade em se adaptar aos *inputs* formando relações progressivamente mais complexas entre os mesmos e mantém uma organização bidimensional dos dados, que é importante na compreensão das relações criadas. As suas características podem permitir compreender o comportamento dos organismos quando expostos a substâncias tóxicas, condição necessária na sua aplicação em sistemas de vídeo rastreio.

1.7. Vídeo Rastreio como Sistema Automático de Alerta Precoce de Perturbações do Meio Aquático

Quando aplicados na prevenção ou avaliação do risco ambiental, os sistemas automatizados de alerta precoce de perturbações do meio aquático devem ser capazes de detetar alterações comportamentais nos organismos testados e produzir um diagnóstico fiável acerca da qualidade do ambiente em que estes se encontram. A tecnologia aplicada neste tipo de estudos tem evoluído de forma acentuada na última década, sendo que os primeiros sistemas utilizavam eletrónica analógica e apenas eram capazes de estudar um único indivíduo e em ambientes extremamente artificiais. Alguns dos exemplos mais engenhosos da aplicação deste tipo de técnicas são a utilização de feixes infravermelhos, ultrassons ou ainda um radar do tipo Doppler (Spink *et al.*, 2001).

No entanto, a utilização de sistemas que recorrem ao uso de imagens de vídeo apresenta claras vantagens, nomeadamente a sua maior simplicidade e flexibilidade, o que resulta em menores custos em termos monetários, de tempo e de esforço. Os sistemas de vídeo rastreio são particularmente eficazes na caracterização e estudo de ações rápidas e/ou breves ou ações durante períodos temporais alargados. Estes são ainda essenciais na determinação de variáveis espaciais como a distância percorrida, a velocidade média de deslocação, entre outras, que de outro modo não poderiam ser avaliadas de uma forma consistente (Spink *et al.*, 2001). São extremamente úteis na monitorização do comportamento de animais aquáticos, por apresentarem uma elevada frequência de amostragem (número de fotogramas/*frames* por segundo) e uma grande resolução espacial (Pittman e Ichikawa, 2013).

Os peixes são organismos que despertam um interesse particular neste campo, porque muitos dos seus comportamentos (considerados ecologicamente relevantes) são

facilmente observados e quantificados. Para além disso, mesmo quando não são fisicamente afetados por um contaminante, podem exibir alterações significativas no seu comportamento, devido à sua enorme capacidade sensorial, principalmente olfativa (Scott e Sloman, 2004).

1.8. Peixe Zebra como Modelo

De entre as inúmeras espécies utilizadas em Ecotoxicologia, o Peixe Zebra (*Danio rerio*) tem-se tornado cada vez mais importante, sobretudo devido ao facto de oferecer um compromisso entre a simplicidade na sua utilização e a complexidade do seu sistema, homólogo a roedores e humanos (Tran e Gerlai, 2014). Apresenta respostas a tóxicos e fármacos semelhantes às observadas em mamíferos, demonstrando a sua capacidade em identificar agentes que representam um risco para a saúde Humana e Ambiental (Powers *et al.*, 2010). É uma espécie altamente prolífica, resiliente, de tamanho reduzido (4 cm) e propensão natural em formar cardume, o que facilita a sua manutenção em laboratório, com um mínimo de esforço e sem perturbar o seu comportamento natural, mantendo as interações e coesão sociais. Para além disso, a capacidade e facilidade de administração de tóxicos solúveis em água de uma forma não invasiva, torna-os ideais em estudos comportamentais (Pannia *et al.*, 2014). De facto, esta espécie é facilmente exposta a substâncias hidrofílicas presentes na água, principalmente pelas brânquias mas também por toda a superfície corporal (Gerlai *et al.*, 2006). Os seus sistemas sensoriais são altamente desenvolvidos e versáteis, representando uma vantagem no que diz respeito à quantidade de técnicas a que podem ser aplicados. Apresentam uma grande sensibilidade vestibular; excelente visão tetracromática; quimio, mecano e termosensibilidade; excelente audição e presença da linha lateral, importante na deteção de estímulos vibratórios (Moorman, 2001).

A utilização do Peixe Zebra não está no entanto limitada à Ecotoxicologia, sendo já a terceira espécie animal melhor caracterizada geneticamente, depois do murganho (*Mus musculus*) e mosca da fruta (*Drosophila melanogaster*) (Grunwald e Eisen, 2002). É um poderoso modelo animal em estudos genéticos, de desenvolvimento e até farmacológicos, exibindo ainda uma variedade de comportamentos sociais e de defesa bastante úteis na caracterização do seu comportamento (*behavioral phenotyping*) (Gerlai, 2003). Diversas variáveis comportamentais podem ser analisadas, como a frequência de paragens na locomoção, duração de movimentos, velocidade linear, distância percorrida, ângulos de viragem, posição na coluna de água, forma e padrão dos movimentos, entre outros (Kane *et al.*, 2004; Blaser e Gerlai, 2006). Mais ainda, uma grande variedade de comportamentos

complexos e/ou sociais podem ser analisados, como a habituação, memória, reflexos, escolha, aprendizagem, atração/repulsão, agressividade, coesão em cardume, entre outros (Blaser e Vira, 2014).

1.9. Os Tóxicos

De forma a colocar à prova o sistema de vídeo rastreio, foram selecionados cinco tóxicos pertencentes a diferentes grupos químicos, número que foi um compromisso entre a disponibilidade de tempo e recursos e a necessidade de desenvolver um trabalho que representasse um esforço e importância significativos.

1.9.1. Lixívia – NaClO

A lixívia, designação comercial do Hipoclorito de Sódio, é atualmente um dos compostos mais utilizados a nível mundial, em diversas atividades como industriais, agrícolas, farmacêuticas, hospitalares e domésticas, principalmente devido às suas capacidades desinfetantes e baixo custo de produção (Magalhães *et al.*, 2007). É utilizado desde o século XVII e é considerado de uso vital na desinfecção e tratamento de água, bem como no controlo de inúmeras doenças infecciosas, especialmente em países com reduzido acesso a água potável (Clasen e Edmondson, 2006). O seu uso indiscriminado e descargas descontroladas no Ambiente representam um problema a nível mundial. São soluções extremamente instáveis e fortemente oxidantes. A sua reação com a água forma Ácido Hipocloroso (HClO), que rapidamente se dissocia em iões Hidrogénio (H^+) e iões Hipoclorito (ClO^-) (Lopez-Galindo *et al.*, 2010a). Os subprodutos da desinfecção gerados resultam de reações entre os iões formados com a matéria orgânica presente na água, mais precisamente com nucleótidos e/ou proteínas. Podem ser subdivididos em quatro categorias: halogénios livres, haloaminas, trihalometanos e organohalogenados. São lipofílicos, estáveis e tóxicos para o Homem e para o Ambiente, por apresentarem capacidade mutagénica, carcinogénica e citotóxica (Monarca *et al.*, 2000). Estudos epidemiológicos demonstraram que o consumo de água tratada com Cloro aumenta o risco de cancro gastrointestinal e do sistema urinário, bem como a incidência de abortos espontâneos e de efeitos no sistema reprodutor e no desenvolvimento (Monarca *et al.*, 2004).

O Hipoclorito de Sódio é uma base forte ($pH > 11$), sendo extremamente corrosivo. Apresenta capacidade de neutralizar aminoácidos livres, atuar como solvente orgânico e

degradar ácidos gordos presentes em membranas celulares. Tem ainda capacidade de oxidar proteínas de forma irreversível, nomeadamente os grupos Sulfidril da Cisteína; gerar espécies reativas de oxigénio (EROs); provocar Peroxidação Lipídica e de interferir com o metabolismo, levando à diminuição da síntese de ADN e à disfunção progressiva de mitocôndrias com subsequente morte celular (Hidalgo *et al.*, 2002; Mohammadi, 2008).

O uso do Hipoclorito de Sódio como antisséptico encontra-se comprovado em bactérias, micobactérias, esporos, vírus, algas e protozoários (Hidalgo *et al.*, 2002). É ainda considerado o desinfetante mais eficiente para a inativação química do vírus da imunodeficiência humana adquirida (VIH) *in vitro* (Aranda-Anzaldo *et al.*, 1992). É uma biomolécula essencial para o sistema imunitário de inúmeros organismos, sendo sintetizada a partir do Peróxido de Hidrogénio e iões de Cloro (catalisada pela enzima Mieloperoxidase) e ativada por fagócitos em zonas de inflamação (Lapenna e Cuccurullo, 1996).

Reduzidas concentrações (0,2 mg/L) provocam fortes impactos nos ambientes aquáticos, nomeadamente em produtores primários, onde podem interferir com a produtividade fotossintética do fitoplâncton (Poornima *et al.*, 2005). Estes valores podem ser encontrados à saída de efluentes de indústrias (Manduzio *et al.*, 2004; Nebot *et al.*, 2006) e até mesmo estações de tratamento de águas residuais, onde o valor de Cloro residual pode atingir 1 mg/L (Pignata *et al.*, 2012).

A exposição de peixes a concentrações subletais deste agente induz alterações comportamentais como letargia e diminuição do ritmo respiratório, que podem estar relacionadas com danos provocados nas brânquias dos animais, apresentando de uma forma dependente da dose de exposição: hipertrofia, hiperplasia, fusão da lamela do epitélio e necrose (Lopez-Galindo *et al.*, 2010b). Estes danos podem comprometer processos fisiológicos ao nível branquial reduzindo as trocas gasosas e diminuindo os níveis de oxigénio.

1.9.2. Lindano - Gama-Hexaclorocicloexano (γ -HCH)

Lindano é a designação comercial dada à fórmula isomérica gama (γ) do composto Hexaclorocicloexano (HCH). O seu uso como inseticida ocorreu de forma exaustiva por todo o globo desde a década de 1940 até fortes restrições serem colocadas à sua utilização, devido aos efeitos adversos observados em organismos não-alvo e à sua persistência no Ambiente. Na agricultura foi utilizado no tratamento de sementes e colheitas, na indústria madeireira como preservante e na pecuária no tratamento contra

ectoparasitas. Atualmente é ainda utilizado como loção tópica no controlo de certos parasitas (Humphreys *et al.*, 2008).

Considerado um Poluente Orgânico Persistente (POP) pertencente à classe dos Organoclorados, o Lindano, possui capacidade de sofrer transporte atmosférico a longas distâncias antes de sofrer deposição, geralmente em zonas mais frias do Planeta (destilação global), tendo já sido detetado no Ártico (Marini *et al.*, 2012). É estável e resistente à degradação química, fotolítica e biológica, apresentando ainda capacidade de bioacumulação e até mesmo biomagnificação, devido à sua elevada lipofilicidade (Bayarri *et al.*, 2001). O seu fator de bioconcentração (FBC), razão entre a concentração no organismo e a concentração no meio, foi calculado para diferentes organismos aquáticos, desde invertebrados a peixes, tendo variado de 43 a 4240 (Geyer *et al.*, 1997). Quando o FBC é superior a 1, considera-se que está a ocorrer acumulação, como tal, os valores obtidos são deveras preocupantes.

A 29 de Abril de 2004 o seu uso foi restringido na União Europeia pela Regulamentação nº 850/2004 (Portugal ratificou a regulamentação pelo Decreto nº 15/2004, de 3 de Junho), tendo sido limitado a reações químicas intermediárias para produção de outros compostos. Antes das medidas de controlo definidas, em 2009, pela Convenção de Estocolmo, as concentrações de lindano encontradas nos ambientes aquáticos podiam atingir níveis de 1 µg/L, em zonas próximas a áreas de cultivo, dez vezes superiores às permitidas pela legislação (Marini *et al.*, 2012). Nos Estados Unidos da América, o seu uso continua a ser permitido em loções tópicas para uso humano no controlo de pulgas e sarna, bem como em atividades do foro veterinário. Um único shampoo para eliminação de piolhos tem capacidade de contaminar perto de 23 mil litros de água, sendo que o custo da sua remoção em estações de tratamento de águas residuais ronda o valor de 3 mil euros (Davis, 2002). Em 2006, encontrava-se registado para uso comercial em 17 países, banido em mais de 50 e fortemente restringido em 33 (Humphreys *et al.*, 2008). Estas discrepâncias na sua utilização causam grandes preocupações ambientais, porque revelam que o seu uso pode ainda estar descontrolado, nomeadamente em países subdesenvolvidos como a Índia (Bijoy-Nandan e Nimila, 2012).

O Lindano é um neurotóxico que interfere com a ação do Ácido Gama-Aminobutírico (GABA), principal neurotransmissor com ação inibidora no sistema nervoso central e essencial na regulação da excitabilidade neuronal. O Lindano interage com o recetor GABA mediado por ligandos (GABAAR), mais precisamente ao nível do local de ligação da picrotoxina, bloqueando o canal iónico e evitando a ligação do GABA ao seu recetor. Sem esta ligação, não se dá a hiperpolarização do neurónio nem a reversão do potencial de

ação deste. Os impulsos nervosos continuam assim a ser transmitidos ao longo do sistema nervoso, o que resulta na hiperestimulação neuronal e muscular, com eventual paralisia e morte (Islam e Lynch, 2012; Nolan *et al.*, 2012). Pode promover ação citotóxica, especialmente em neurónios, medida também pela interação com o recetor GABA (Vale *et al.*, 1998). Pode ainda ter efeitos de disrupção endócrina, nomeadamente por afinidade à ligação do Recetor Estrogénico, o que resulta em atividade xenoestrogénica deste composto (Briz *et al.*, 2011).

No Homem, uma exposição aguda ao Lindano pode resultar em sintomas de origem neurológica como ataxia, desorientação, tremores, convulsões e, em alguns casos, até mesmo morte. Uma exposição crónica pode resultar em graves efeitos sistémicos como diminuição da função do fígado, arritmia, degeneração cardíaca e necrose de vasos sanguíneos, com consequente diminuição do aporte de sangue no cérebro, pulmões e rins (Nolan *et al.*, 2012).

Em peixes, nomeadamente em *Etroplus maculatus*, a exposição a níveis subletais de lindano (1 µg/L – 5 µg/L) resultou no aumento de movimentos erráticos e espasmos. Outros comportamentos anormais incluíram aumento significativo da frequência respiratória, movimento opercular, movimento das barbatanas e agressividade. Estes efeitos revelaram ser dependentes da dose e do tempo de exposição, sendo mais frequentes a maiores concentrações e estágios iniciais de contaminação. Manifestações patológicas nas brânquias foram também evidentes e incluíram hiperplasia, inchaço, inflamação, secreção de muco e necrose dos tecidos. No fígado, as alterações incluíram degeneração de hepatócitos, formação de vacúolos e constrição dos vasos sanguíneos. O aumento da concentração deste composto resultou em inchaço acentuado e zonas de necrose difusas. Nos rins registou-se a destruição dos túbulos contornados e formação de vacúolos nas células epiteliais dos mesmos. Ocorreu ainda diminuição do tamanho do glomérulo, aumento da cápsula de Bowman e proliferação de células epiteliais com alterações evidentes no volume celular e nuclear (Bijoy-Nandan e Nimila, 2012).

1.9.3. Tributilestanho (TBE)

O Tributilestanho é um grupo de compostos organometálicos extremamente tóxicos, utilizados em diversas atividades industriais devido às suas capacidades desinfetantes e preservantes. Como o próprio nome indica, o elemento metálico presente é o Estanho e encontra-se covalentemente ligado a três grupos Butil e a outro elemento, como o Hidrogénio, sendo que a natureza deste último influencia as propriedades físico-químicas do composto, como a sua solubilidade. A sua extensa utilização desde a década

de 1960, principalmente como aditivo em tintas anti-incrustantes para grandes navios, tornou-o um dos contaminantes aquáticos mais comuns, sendo considerado o mais importante e prioritário contaminante presente em ecossistemas marinhos e de água doce na Europa (Antizar-Ladislao, 2008). Devido à sua elevada toxicidade, persistência no Ambiente, capacidade de bioacumulação e ainda de disrupção endócrina, a sua utilização encontra-se fortemente restringida, tendo sido proibida como aditivo de tintas desde 1 de Janeiro de 2008 pela Organização Marítima Internacional (Antizar-Ladislao, 2008).

Os estudos sobre o TBE ganharam importância quando o aumento da utilização de tintas anti-incrustantes começou a ser relacionado com o declínio de espécies de moluscos e bivalves em áreas costeiras. Uma das primeiras evidências deste facto surgiu em 1970, com o aumento da incidência do fenómeno de *imposex* em *Nucella lapillus* no Reino Unido (Blaber, 1970). Esta condição caracteriza-se pelo aparecimento de caracteres sexuais masculinos não funcionais em fêmeas de gastrópodes e encontra-se relacionada com os efeitos de disrupção endócrina do TBE. Este composto aumenta os níveis de testosterona nos organismos afetados, por inibição da aromatização de androgénios a estrogénios por parte do Citocromo P-450 (Thresher *et al.*, 2011). Outro exemplo bastante mediático teve lugar no final dos anos de 1970, na baía de Arcachon (França), onde foram registados elevados prejuízos económicos devido ao colapso da indústria de produção de ostras da região (Ruiz *et al.*, 1996).

Uma vez introduzido no Ambiente, e principalmente devido à sua baixa solubilidade e elevada densidade, o TBE pode aderir ao sedimento, ser adsorvido pela matéria em suspensão ou incorporado nos tecidos de organismos aquáticos. Em produtores primários e organismos filtradores pode bioacumular, principalmente por absorção através da água e sedimentos, sendo depois biomagnificado até ao topo da cadeia alimentar. Para organismos de níveis tróficos superiores, incluindo o Homem, a principal via de exposição ocorre através da alimentação (Antizar-Ladislao, 2008).

Em condições favoráveis, o TBE pode ser degradado a Dibutilestanho, Monobutilestanho e por fim a Estanho inorgânico, tornando-se progressivamente menos tóxico. Estes mecanismos podem ser acelerados por radiação ultravioleta, aumento da temperatura (volatilização) e principalmente por aumento da atividade biológica (Antizar-Ladislao, 2008).

Em zonas com elevado movimento de embarcações, como canais, portos ou marinas, as concentrações de TBE encontradas nos sedimentos podem ser extremamente elevadas e atingir valores de 5,48 µg/g, como os registados em Espanha (Arambarri *et al.*, 2003), ou em casos pontuais 14 µg/g, como os registados no Japão (Harino *et al.*, 2007).

Em água doce, o tempo de semivida do TBE pode atingir os 5 meses, no entanto, quando incorporado nos sedimentos, e principalmente em condições anaeróbicas, a sua persistência estimada poderá rondar as dezenas de décadas (Dowson *et al.*, 1996). Este é um aspeto muito importante, dado que os sedimentos funcionam não só como reservatório, mas também como fonte de contaminação, porque pode ocorrer ressuspensão do composto, por exemplo, por modificações físicas no sedimento. Apesar de originalmente ter sido considerada uma das grandes vantagens da utilização deste biocida, esta capacidade de persistência torna-o extremamente nocivo para o Ambiente, sendo que as restrições a que foi sujeito podem levar um período de tempo considerável até surtirem efeitos. Para além disso, a sua utilização em países subdesenvolvidos e no tratamento e preservação de madeiras e outros materiais continua a representar um enorme risco ecológico (Sudaryanto *et al.*, 2002; Antizar-Ladislao, 2008).

O seu principal mecanismo de toxicidade resulta da inibição da fosforilação oxidativa com repercussões na função e estrutura das mitocôndrias. O metabolismo do TBE envolve a ação do sistema mono-oxidase do Citocromo P-450, sendo que a atividade reduzida desta enzima em moluscos e bivalves pode explicar a maior sensibilidade deste grupo de organismos a este composto (Ruiz *et al.*, 1996). Outro aspeto importante, que pode contribuir para esta sensibilidade, é a sua elevada capacidade de acumulação, sendo estas espécies as que apresentam os maiores valores de FBC, como por exemplo, 90.000 em *Mya arenaria* (Yang *et al.*, 2006). Para as espécies consumidoras destes organismos, como o Homem, a sua ingestão pode implicar sérios riscos.

Mesmo quando a contaminação é reduzida, uma exposição crónica a este composto resulta no declínio de populações, principalmente de gastrópodes, por ação de disrupção endócrina e consequente efeito negativo na reprodução e sustentabilidade das espécies. Estes efeitos são observados a concentrações tão reduzidas como 1 ng/L (Peachey, 2003). Em peixes, o TBE pode levar à completa reversão sexual de fêmeas de *Paralichthys olivaceus* expostas a concentrações ecologicamente relevantes deste composto (Shimasaki *et al.*, 2003), em *D. rerio* a exposição resulta no aumento da percentagem de indivíduos masculinos numa população e alterações morfológicas nos espermatozoides, a níveis tão reduzidos como 0,1 ng/L (McAllister e Kime, 2003).

1.9.4. Mercúrio

O Mercúrio é um elemento químico metálico com características únicas, particularmente devido à sua forma líquida à temperatura e pressão ambiente. Apesar da

sua toxicidade, foi usado desde a pré-história como pigmento, utilizado no século XIX como tratamento para a Sífilis e outras doenças, e aplicado nos dias de hoje em diversos produtos como diuréticos, cosméticos, amálgamas dentárias, termostatos e muitos outros, bem como na indústria química, metalúrgica, mineira e farmacêutica (Richetti *et al.*, 2011).

O Mercúrio existe em três formas: elementar, orgânica e inorgânica. A primeira é utilizada pelo Homem e aplicada em diversas atividades e instrumentos. A forma orgânica ocorre por combinação da anterior com elementos contendo carbono. Por último, a forma inorgânica é formada por combinação com elementos que não contêm carbono, levando à formação de sais ou cristais. As formas orgânicas apresentam uma maior lipofilicidade e afinidade com complexos proteicos, o que aumenta a sua capacidade em atravessar barreiras, como as presentes no cérebro e na placenta. As formas inorgânicas apresentam uma menor capacidade de difusão entre membranas, mas são geralmente espécies mais hidrofílicas, com tendência a acumular nos rins. A forma elementar apresenta a menor toxicidade, por ser menos solúvel e apresentar maior dificuldade de absorção por parte dos organismos (Korbas *et al.*, 2012).

O ciclo do Mercúrio é complexo e sujeito a conversões que dependem de fenômenos como: volatilização, deposição, erosão, metilação, redução, entre outros. O Mercúrio elementar encontra-se na sua maioria na atmosfera, onde pode ser transportado a longas distâncias. Esta forma pode ser absorvida pelo sistema respiratório dos organismos terrestres ou condensar e depositar, nomeadamente em ambientes aquáticos. Uma vez no Ambiente, o Mercúrio pode sofrer processos de biotransformação, como metilação por parte de bactérias sulfo-redutoras, formando-se Monometilmercúrio, a forma mais tóxica e estável deste metal. É facilmente absorvido através da água ou ingerido durante a alimentação e apresenta capacidade de bioacumulação em grandes quantidades. A forma inorgânica encontra-se presente em depósitos naturais e é libertada em grandes quantidades durante processos industriais, sendo a forma mais abundante no planeta (Korbas *et al.*, 2012).

A principal via de toxicidade do Mercúrio deve-se à acumulação em tecidos ou órgãos e produção de *stress* e dano oxidativo por formação de EROs, com consequente depleção das defesas antioxidantes. É responsável por alterações no metabolismo de certas proteínas associadas ao desenvolvimento de doenças neuro-degenerativas como Alzheimer, Parkinson e Esclerose Lateral Amiotrófica (Richetti *et al.*, 2011). Está ainda envolvido em fenômenos como redução de fertilidade, imunotoxicidade e inibição da atividade mitocondrial (Cambier *et al.*, 2009; Cruz *et al.*, 2013).

A toxicidade do Mercúrio tornou-se evidente após um dos maiores desastres ambientais dos tempos modernos, e deveu-se à libertação de água contaminada com Metilmercúrio por parte de efluentes industriais, entre 1932 a 1968, na baía da cidade Japonesa de Minamata. Um dos primeiros sinais de toxicidade foi observado em gatos que apresentavam um comportamento alterado, com evidentes dificuldades motoras. Este efeito comportamental foi pela primeira vez relacionado com a contaminação presente na baía em 1956, sendo nesta altura demasiado tarde para evitar o desastre. A doença de Minamata, como ficou conhecida, é caracterizada por sintomas como ataxia, perturbações visuais e auditivas, dificuldades de memória, fraqueza muscular, convulsões e em casos extremos paralisia e morte (Cambier *et al.*, 2009). Este episódio foi não só um alerta para o extremo potencial tóxico deste elemento, como também para a sua facilidade de bioacumulação e biomagnificação ao longo da cadeia alimentar.

Os níveis de Mercúrio no Ambiente podem variar de forma significativa, principalmente por proximidade ou não a fontes de poluição antropogénica, como a indústria química ou mineira. Apesar de ser considerado um poluente prioritário pela Diretiva Quadro da Água (União Europeia) e Agência de Proteção Ambiental (Estados Unidos da América), ainda são registadas concentrações ambientais elevadas, como 20 µg/L, reportadas em Espanha (Nevado, 2003; Cruz *et al.*, 2013). A Organização Mundial de Saúde (OMS) estima que a dose diária a que um Homem adulto está exposto é de 4,3 e 2,4 µg de mercúrio inorgânico e orgânico, respetivamente (WHO, 1991).

Em peixes, o Mercúrio demonstra capacidade de disrupção de funções vitais como reprodução, osmorregulação, orientação, predação, entre outras, bem como uma variedade de efeitos teratogénicos (Samson *et al.*, 2001).

1.9.5. Formaldeído:

O Formaldeído é um composto orgânico com fórmula química CH_2O e comum no Meio Ambiente. Quimicamente é o aldeído mais simples mas também um dos mais reativos. É, por exemplo, formado pela decomposição de material vegetal ou queima de combustíveis fósseis e está presente em alimentos não cozinhados, por ser um metabolito natural do organismo. Os seus usos são variados e incluem a sua aplicação como agente esterilizante, aditivo em resinas, bem como preservante alimentar e de espécimes biológicos. É aplicado em produtos do dia-a-dia como elixir ou pasta dentífrica. Trata-se de um composto gasoso a temperatura e pressão ambiente, sendo as soluções comerciais aquosas, de forma a permitir a sua aplicação de uma maneira mais prática. Estas têm o nome de Formol ou Formalin e contêm estabilizantes, geralmente Metanol, de forma a

evitar a formação de polímeros. Não é previsto que a presença de Metanol represente um potencial tóxico relevante porque em primeiro lugar a sua concentração é baixa (10-15%) e segundo, os seus valores de CL₅₀, quando testados de forma isolada, são cerca de duas ordens de grandeza superiores (Hohreiter e Rigg, 2001).

Recentemente, tem-se verificado um aumento significativo do uso de Formol para controlo de ectoparasitas, protozoários e fungos em produções de aquacultura, fator que representa um forte risco ecológico (Hohreiter e Rigg, 2001). Um aspeto interessante e controverso da sua utilização nesta atividade é o facto de o seu uso ser permitido nos Estados Unidos da América ou Canadá e proibido na Europa, Austrália ou Japão. A sua restrição, nestes países, deve-se ao facto de ser considerado um carcinogénico humano. Em relação aos efeitos de uma exposição crónica, estes podem incluir cegueira ou asma (Uddin *et al.*, 2011). A sua utilização em aquacultura acarreta graves problemas para o Ambiente, particularmente por ser responsável pela morte de fitoplâncton, zooplâncton e organismos bênticos expostos aos efluentes destas atividades. O crescimento de espécies como *Chaetoceros gracilis* ou *Nitzschia sp.* é inibido a concentrações de apenas 5 mg/L. Algas do género *Scenedesmus* apresentam uma sensibilidade particular com um valor de CL₅₀-96h de apenas 0,4 mg/L (Jung *et al.*, 2001). Apesar do tempo de semivida ser relativamente curto, a rondar os quatro dias, o facto de poder ser continuamente libertado para o ambiente por parte destes efluentes representa um obstáculo significativo para as comunidades biológicas presentes (Jung *et al.*, 2001).

O conhecimento atual sobre o seu mecanismo de ação é bastante limitado e existem apenas hipóteses que foram revistas recentemente na literatura em 2011 por Duong *et al.* e que incluem: capacidade genotóxica com indução da formação de aberrações cromossómicas, micronúcleos, entre outros; produção de EROs e promoção de citotoxicidade e ainda disrupção de atividade proteica, enzimática e hormonal. Outro aspeto importante a ter em consideração é a inexistência de indicadores que revelem capacidade de bioacumulação (Hohreiter e Rigg, 2001).

Em *D. rerio* uma exposição a uma concentração de 40 mg/L revelou primeiramente um aumento da atividade natatória seguida de diminuição do ritmo de movimentos operculares. Estas observações foram corroboradas pelo aumento da frequência do número de saltos seguido de perda de equilíbrio, secreção de muco e diminuição progressiva da atividade e consumo de oxigénio. Esta última pode estar relacionada com a capacidade redutora do Formol, diminuindo os níveis de oxigénio presentes na água, ou com a sua capacidade em danificar os tecidos epiteliais das brânquias, dificultando a hematose branquial (Varusai *et al.*, 2012).

1.10. Objetivos do Trabalho

O aumento das pressões exercidas pelo Homem sobre o Ambiente tornam imperativo um estudo e um conhecimento extensivo do efeito que determinados contaminantes podem ter nas comunidades biológicas, como tal, é necessário desenvolver ferramentas que permitam avaliar esses mesmos efeitos de uma forma rápida e fácil.

O objetivo deste trabalho foi criar e testar um sistema automático de vídeo rastreio para deteção de perturbações do meio aquático, confrontando-o com cinco tóxicos de natureza química distinta, de forma a verificar o seu potencial espectro de ação. Para tal, foram criadas três unidades de filmagem idênticas que permitiram controlar, de forma igual e simultânea, todas as condições experimentais necessárias. Foi ainda construído um modelo estatístico recorrendo a uma Rede Neuronal Artificial do tipo SOM em conjunto com uma Análise de Correspondência e calculadas várias medidas de qualidade de diagnóstico, nomeadamente os valores de exatidão, sensibilidade, especificidade, falsos positivos, falsos negativos, valor preditivo positivo (VPP) e valor preditivo negativo (VPN) dos diagnósticos por ele obtidos. Estes valores serviram para validar a eficácia do sistema. Desta forma torna-se possível perceber se o modelo é capaz de produzir diagnósticos corretos em relação à presença ou ausência de contaminação, mas também se é capaz de apresentar resultados consistentes quando confrontado com contaminantes de natureza bastante distinta.

2. Material e Métodos

2.1. Preparação do Material

Procedeu-se à montagem de dois aquários Tetra de 50 litros (64 cm comprimento, 34 cm altura e 29 cm largura), equipados com bombas de filtração de água Tetra GmbH D-49304 e resistências elétricas TetraTec HT50, bem como à preparação das três unidades de filmagem.

De uma forma geral, o sistema de filmagem foi constituído da seguinte forma:

1. Sistema de iluminação: composto por 12 (3x4) lâmpadas LED cilíndricas (50 cm de comprimento, 3 cm de diâmetro e 60 watts de potência).
2. Três banhos-maria (48 cm de comprimento, 36 cm de largura e 17 cm de altura): equipados com resistências elétricas TetraTec HT50 e bombas de filtração de água Tetra GmbH D-49304 para garantir a manutenção da temperatura da água a 28°C.
3. Isolamento: composto por placas de cortiça expandida com 2 cm de espessura, formando um único compartimento de 200 cm comprimento, 120 cm altura e 60 cm largura a toda a volta das três unidades, nomeadamente as laterais, a parte de trás e da frente.
4. Sistema de gravação: constituído por três câmaras Flow Electronics 540L IR ligadas a um computador Intel® Pentium® Dual CPU (2:00 E2180@2.00 GHz, 1.87 GB RAM) com sistema operativo Microsoft Windows XP Home Edition version 2002 Service Pack 3, com *software* de filmagem DSS1000, versão 4.7.0041.

A disposição do sistema que apresentou melhores resultados foi: iluminação no plano inferior, banhos-maria e arenas no plano médio e sistema de gravação no plano superior, como esquematizado na Figura 1. A base dos banhos-maria foi composta por uma placa de plástico branco de 3 mm de espessura, para permitir e otimizar a passagem da luz e fornecer um maior contraste entre peixe/arena e facilitar a filmagem.

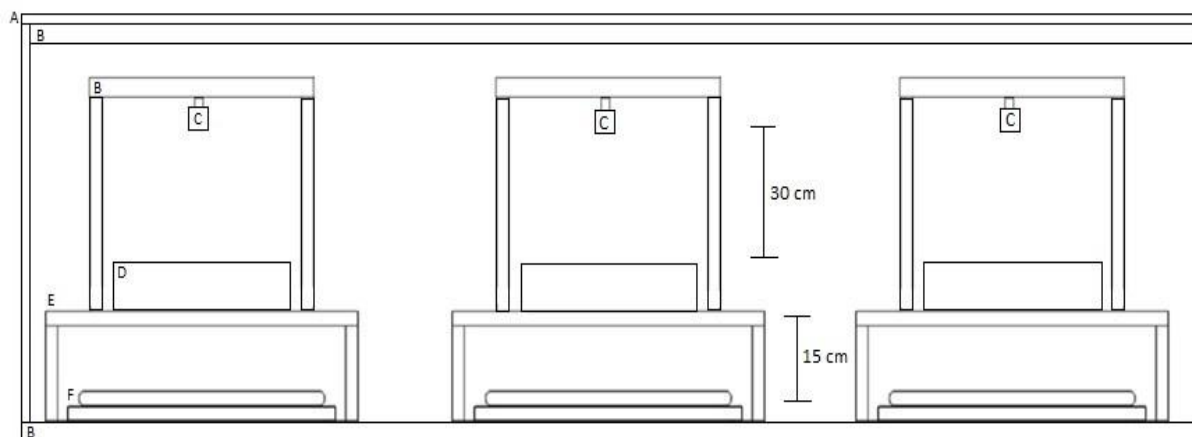


Figura 1 - Disposição esquemática do sistema de filmagem: A - cortiça expandida; B - espuma rígida de poliestireno; C - câmara 540L IR; D - banho-maria; E – vidro transparente; F - iluminação.

Foi necessária a construção de doze arenas de filmagem individuais, que consistiu na montagem de três aquários (35 cm comprimento, 15 cm altura e 20 cm largura) com vidros de 2 mm de espessura, divididos internamente em quatro secções iguais e opacas, de maneira a individualizar cada peixe e respetiva condição experimental. Cada secção comportou 1,5 litros, equivalentes a 10 cm de coluna de água, o suficiente para manter o comportamento natural da espécie. Estas arenas eram colocadas no interior dos respetivos banhos-maria, como é possível ver na Figura 2.

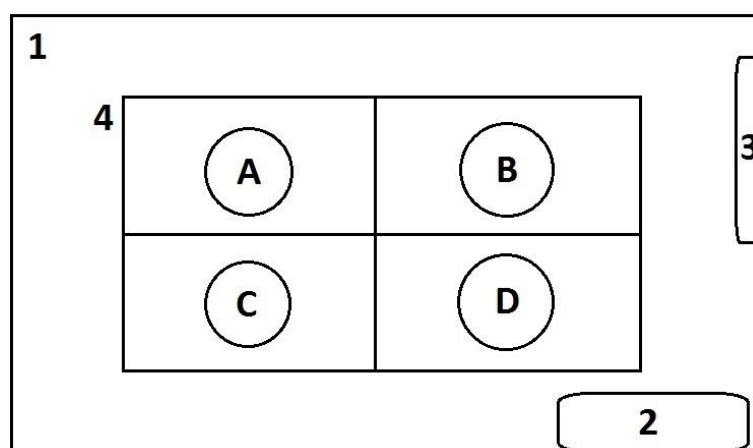


Figura 2 - Disposição esquemática dos banhos-maria (vista superior): 1 - banho-maria; 2 - bomba de filtração de água Tetra GmbH D-49304; 3 - resistência elétrica TetraTec HT50; 4 - arenas de filmagem (condições experimentais A, B, C e D)

Todos os aquários e arenas foram mantidos a uma temperatura constante de $28^{\circ}\text{C}\pm 1$, ideal para a espécie, temperatura esta controlada pelas resistências e monitorizada com a ajuda de cinco termómetros internos de mercúrio LX-012-A.

2.2. Aquisição dos Animais

Os 150 peixes *D. rerio* de estirpe selvagem, com cerca de cinco meses de idade e 2,5 cm de comprimento, provenientes do mesmo lote, foram adquiridos na empresa Orniex Gaia, e foram acondicionados num dos aquários Tetra 50. Os organismos dispuseram de um período de adaptação de um mês antes de qualquer ensaio. Os organismos foram alimentados uma vez por dia (depois da hora prevista dos ensaios, de forma a não interferir com a consistência dos resultados) com TetraMin Bio Active Formula e mantidos num fotoperíodo de 12 horas de luz/12 horas de escuridão. Cada peixe foi utilizado uma única vez e nenhum dos animais sofreu danos permanentes ou morte durante as experiências. Após a sua utilização foram mantidos no segundo aquário Tetra 50.

2.3. Escolha dos Tóxicos

De forma a colocar verdadeiramente à prova a capacidade de diagnóstico do sistema de vídeo rastreio e ao mesmo tempo produzir resultados importantes de um ponto de vista ecológico, um dos passos mais importantes do trabalho prendeu-se com a escolha dos tóxicos a utilizar. Existiram alguns critérios que foram essenciais na seleção dos mesmos, nomeadamente:

1. A sua acessibilidade, o que resulta em custos monetários mais reduzidos.
2. A sua facilidade de utilização, nomeadamente a sua solubilidade em água à concentração pretendida e diminuídos riscos durante a sua manipulação.
3. A capacidade de eliminação, principalmente das soluções *stock* preparadas.
4. A possibilidade de representarem um importante risco ecológico, podendo ser classificados de contaminantes prioritários, emergentes e/ou controversos.
5. As concentrações utilizadas estarem dentro dos valores observados nos ecossistemas, mesmo que de forma pontual.
6. A existência de valores conhecidos de CL_{50} para Peixe Zebra, de forma a calcular as concentrações a utilizar.
7. O conhecimento dos efeitos e modo de ação dos tóxicos, de forma a ser possível relacioná-los com as (possíveis) variações comportamentais.

8. O seu uso prévio em outros trabalhos, de forma a tornar possível a discussão dos resultados.
9. A necessidade de todos os tóxicos escolhidos serem bastante diferentes entre si, pertencendo inclusive a famílias químicas distintas.

Todos os tóxicos utilizados foram testados durante uma hora de exposição, a uma concentração equivalente a 9% do CL₅₀-96h, calculado em ensaios toxicológicos convencionais e presentes na literatura. Estes valores foram selecionados por terem apresentado resultados bastante favoráveis em experiências anteriormente realizadas (para publicação). Permitiram colocar à prova a capacidade de diagnóstico do sistema pelo facto de serem concentrações baixas e ecologicamente relevantes. Outro aspeto importante foi o facto de se evitar danos permanentes nos organismos testados, uma das condições consideradas essenciais. O reduzido tempo de exposição é fundamental dado que torna possível obter um maior número de diagnósticos num menor espaço de tempo. A baixa concentração e o reduzido tempo de exposição podem não ser relevantes para causar danos nos organismos testados, mas serem suficientes para revelar alterações comportamentais que possam ser detetadas pelo sistema.

As concentrações utilizadas e os valores de CL₅₀-96h para *D. rerio* que estiveram na sua origem são apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 - Resumo das concentrações utilizadas e valores de CL₅₀-96h que estiveram na sua origem, para os compostos Hipoclorito de Sódio, Lindano, TBE, Cloreto de Mercúrio e Formol.

Composto	CL ₅₀ -96h para <i>Danio rerio</i>	Concentração utilizada
Hipoclorito de Sódio	5,53 mg/L (Pitanga, 2011)	0,5 mg/L
Lindano	0,10 mg/L (Ensenbach e Nagel, 1995)	10 µg/L
TBE	2,7 µg/L (Martins <i>et al.</i> , 2007)	0,243 µg/L
Cloreto de Mercúrio	0,05 mg/L (Martins <i>et al.</i> , 2007)	4,5 µg/L
Formol	41 mg/L (Liu <i>et al.</i> , 2011)	3,69 mg/L

Para todos os tóxicos foi preparada uma solução *stock* com água desionizada e mantida em agitação durante a noite, para garantir a completa dissolução dos reagentes. Seguidamente, foram armazenadas a uma temperatura constante e protegidas da luz de forma a evitar fotodegradação. Um limite de segurança de pelo menos dez vezes foi mantido em relação ao limite de solubilidade a 25°C. As soluções *stock* foram preparadas de forma a ter em conta a sua concentração e permitir que todas as condições experimentais fossem contaminadas com o mesmo volume de solução, cerca de 24 mL.

O Hipoclorito de Sódio (NaClO – 5%, CAS 7681-52-9) foi adquirido na empresa PanReac AppliChem e o Lindano (γ-BHC – 97%, CAS 58-89-9), TBE (TBTO – 96%, CAS 56-35-9), Mercúrio (HgCl₂ ≥ 99.5%, CAS 7487-94-7) e Formol (HCHO – 36.5-38%, CAS 50-00-0) na empresa Sigma-Aldrich.

2.4. Ensaio Definitivo

Foram realizadas nove repetições do ensaio definitivo para permitir a validação estatística dos resultados. Cada ensaio foi constituído por dois tempos de filmagem de uma

hora: “Antes” e “Depois” da contaminação. Foram selecionadas apenas fêmeas para facilitar a gravação (sendo maiores eram mais visíveis e evitou-se introdução de variáveis como diferenças de gênero, peso, e tamanho). Cada unidade de filmagem possuía um aquário com quatro secções isoladas por vidro opaco (arenas). Cada arena era única e representava apenas uma condição experimental. Existiram seis condições experimentais em cada ensaio (cinco contaminantes e um controlo negativo) e duas réplicas por condição. A distribuição das condições pelas arenas foi sempre aleatória mas as duas réplicas nunca ficaram na mesma unidade de filmagem.

Os ensaios foram realizados durante o período de maior atividade dos peixes, entre as 10 e as 16 horas (MacPhail *et al.*, 2009), e seguiram os seguintes passos:

Tempo “Antes”:

- Confirmação das temperaturas do aquário Tetra 50 que mantinha o lote de peixes e das arenas de filmagem a $28^{\circ}\text{C}\pm 1$, condição necessária à realização dos ensaios.
- Seleção de 12 fêmeas do aquário Tetra 50 e transferência das mesmas para as arenas de filmagem.
- Tempo de habituação de 15 minutos (Gerlai *et al.*, 2009).
- Falsa contaminação das arenas com água desionizada. O volume utilizado, cerca de 24 mL, não afetava significativamente a altura da coluna de água e era pipetado facilmente utilizando uma micro pipeta Gilson Pipetman 100 mL.
- Novo tempo de habituação de 15 minutos.
- Gravação de uma hora - Pré-exposição, para permitir que cada peixe fosse utilizado como controlo de si próprio.

Tempo “Depois”:

- Contaminação das diferentes condições experimentais com 24 mL de solução: 1. Água desionizada (controlo negativo); 2. Lixívia; 3. Lindano; 4. TBE; 5. Cloreto de Mercúrio; 6. Formol.
- Tempo de habituação de 15 minutos.
- Gravação de uma hora - Pós-exposição.
- Terminada a hora de gravação, transferência dos peixes para o segundo aquário Tetra 50, utilizado apenas para manter os peixes já utilizados.

Os procedimentos do tempo “Antes” e do tempo “Depois” foram equivalentes de forma a sujeitar os peixes ao mesmo tipo de manipulações e evitar a introdução de variáveis.

2.5. Tratamento de Imagem

No final de cada ensaio resultavam seis gravações, uma de cada unidade de filmagem no tempo “Antes” e no tempo “Depois”. Este tipo de gravação convencional não pôde ser utilizada diretamente, dado que as diferentes condições experimentais não se encontravam individualizadas nem os dados eram compatíveis com os programas de análise estatística utilizados para validação dos resultados, neste caso o programa *Statistica* versão 10 (*StatSoft*, 2011). Por esse facto as gravações tiveram de sofrer tratamento.

De uma maneira geral, o objetivo do tratamento de imagem consistiu em individualizar cada peixe e transformar a sua localização na arena em coordenadas X e Y que pudessem depois ser analisadas.

Em primeiro lugar, converteu-se o formato de vídeo numa sequência de imagens individuais (*frames*). Para isso foi utilizado o programa *VirtualDub*, fazendo a conversão do formato AVI para o formato *ImageSequence*. Em seguida, recorrendo ao programa *ImageJ*, cada condição experimental foi individualizada; cada peixe transformado num ponto negro com o fundo a branco e, por fim, com recurso à ferramenta *MultiTracker*, cada ponto negro foi reconhecido como uma coordenada, sendo depois essa informação exportada para uma tabela de *Excel*. Para esse efeito, cada fotograma importado inicialmente pelo programa *ImageJ* foi convertido para uma escala de cinzentos a 8-bit (8-bit *grayscale*). Com recurso à ferramenta *Rolling Ball Background* com um filtro de fundo claro (*light background filter*) os *frames* foram limpos, de forma a eliminar possíveis interferências nas imagens, como sombras, e aumentar o contraste dos animais (Figura 3).



Figura 3 - Exemplo da aplicação do filtro de fundo claro (*light background filter*) e ferramenta de *Rolling Ball Background* no programa *ImageJ*.

Com a ferramenta de seleção poligonal, cada arena de filmagem individual foi selecionada e o restante eliminado (Figura 4). Como a posição das câmaras e das arenas não se alterou durante os ensaios, esta seleção só foi feita uma vez no início de cada ficheiro de gravação, para cada uma das quatro arenas, sendo o programa capaz de assumir a mesma seleção nos fotogramas seguintes. Esta seleção foi necessária uma vez que a ferramenta de *MultiTracker* apresenta melhores resultados quando segue a trajetória de apenas um peixe a cada momento.

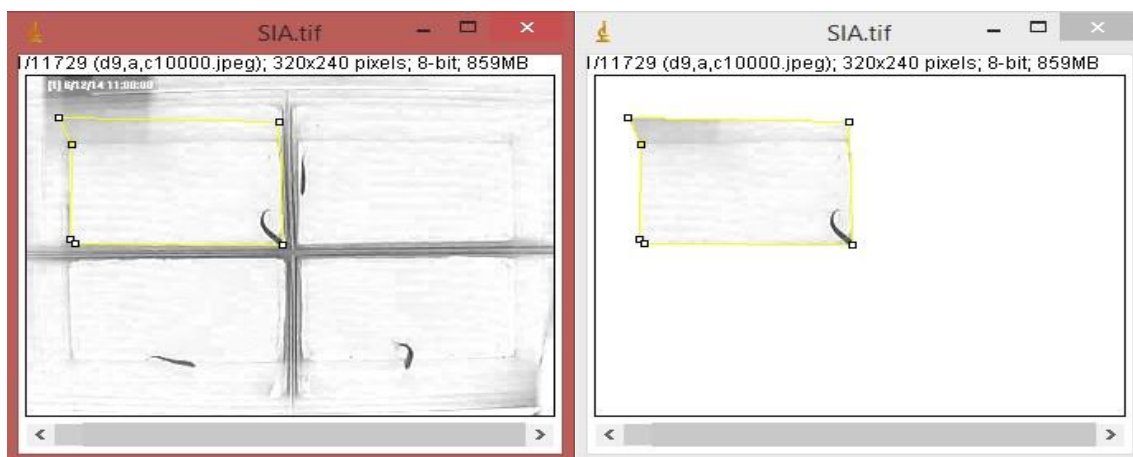


Figura 4 - Exemplo da utilização da ferramenta de seleção poligonal no programa *ImageJ*.

Através da ferramenta de alteração de *Threshold* foi possível tornar cada peixe num ponto negro com tudo o resto a branco (Figura 5). Cada *Threshold* foi introduzido individualmente no início das gravações de acordo com os resultados que apresentava, sendo depois o programa capaz de assumir o mesmo valor para os fotogramas seguintes.

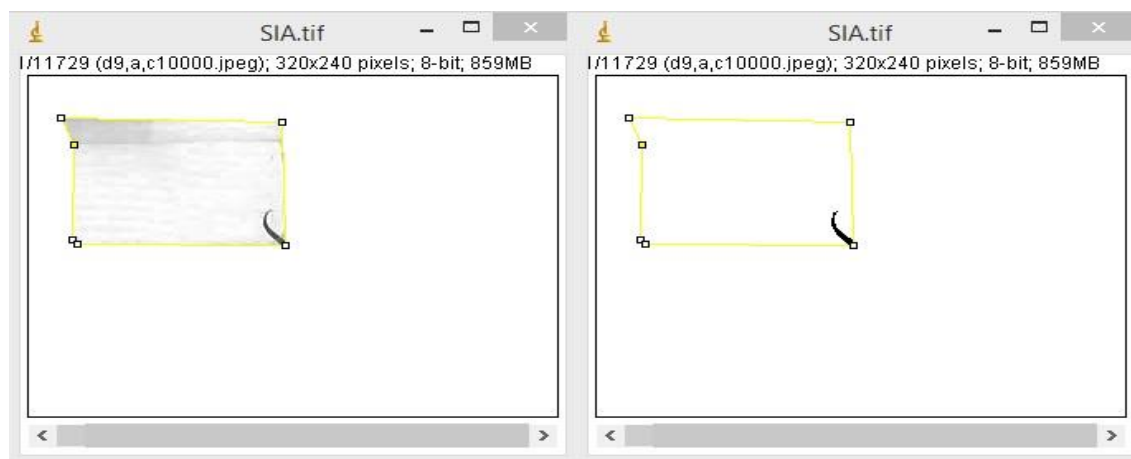


Figura 5 - Exemplo da aplicação da ferramenta de alteração de *Threshold* no programa de *ImageJ*.

Depois destes processos foi possível utilizar a ferramenta de *MultiTracker*, esta ferramenta calculou as coordenadas dos organismos em cada fotograma individual. Esta informação foi exportada para uma tabela de formato *Excel* com três colunas, nomeadamente as coordenadas X e Y e o número do *frame* correspondente. Aos diferentes ficheiros *Excel* foram dadas denominações distintas, de forma a se identificar facilmente a que condição experimental se tratava, nomeadamente o número do ensaio (1 a 9), data, hora inicial da gravação, momento da gravação (“Antes” ou “Depois” da contaminação), câmara (esquerda, centro ou direita), arena (A, B, C, ou D) e tóxico (Controlo, Lixívia, Lindano, Tributilestanho, Mercúrio ou Formol).

Com a informação da localização do peixe transformada numa tabela de coordenadas X e Y foi possível calcular nove parâmetros descritores do movimento e fazer a análise estatística em programas convencionais. Todas as coordenadas foram centradas para que cada arena tivesse a mesma posição espacial, como se todas elas estivessem sobrepostas.

2.6. Análise Estatística

Foi realizada uma *Cluster Analysis* com recurso ao algoritmo *Kohonen*, um tipo de rede neuronal artificial com aprendizagem sem supervisão (Kohonen, 2001), utilizando para o efeito o programa *Statistica* versão 10 (*StatSoft*, 2011). Esta análise agrupou os dados consoante a sua semelhança, definindo diferentes classes de comportamentos dos peixes. Para este efeito, foram utilizadas como *input variables* nove parâmetros comportamentais:

1. Valor médio da coordenada X (mm).
2. Valor médio da coordenada Y (mm).
3. Velocidade linear (mm/s).
4. Velocidade angular (graus/s).
5. Aceleração linear (mm/s²).
6. Aceleração angular (graus/s²).
7. Raiz quadrada do produto dos desvios padrão X Y (medição da dispersão do peixe).
8. Ângulo entre os segmentos formados pelas coordenadas do peixe em três *frames* sucessivos.
9. Grau de curvatura por unidade de deslocação (graus/mm) (*meander* absoluto).

O diagnóstico (presença de contaminação na água) foi feito a partir das classes comportamentais criadas, recorrendo à Análise de Correspondência e Projeções Escalares (ver Capítulo 3.3 - Análise de Correspondência).

Para a *Cluster Analysis* foi necessário avaliar três séries temporais, ou seja, três tempos distintos e aleatórios. A primeira série, denominada “Treino”, serviu para o modelo aprender e ajustar-se aos resultados. A segunda série, denominada “Teste”, serviu para calibrar o modelo. A terceira série, denominada “Validação”, serviu para validar o modelo.

Foram calculados valores de exatidão, sensibilidade, especificidade, falsos positivos, falsos negativos, VPP e VPN (Langlotz, 2003; Drobatz, 2009). A “Exatidão” é uma medida indicadora da qualidade geral do método, porque corresponde à proporção de diagnósticos corretos tendo em conta toda a população de resultados. Pode ser calculada pelo quociente entre o número de diagnósticos corretos face ao total de diagnósticos realizados. A “Sensibilidade” mede a capacidade do método identificar corretamente a presença de toxicidade. Pode ser calculada pelo quociente entre o número de diagnósticos positivos corretos face ao total de condições experimentais com tóxico, mesmo quando incorretamente diagnosticados (falsos negativos). A “Especificidade” mede a capacidade do método identificar corretamente a ausência de toxicidade. Pode ser calculada pelo

quociente entre o número de diagnósticos negativos corretos face ao total de condições experimentais sem tóxico, mesmo quando incorretamente diagnosticados (falsos positivos). Os “Valores Preditivos” indicam a probabilidade de, perante um resultado positivo ou negativo, existir ou não toxicidade. O “Valor Preditivo Positivo” é dado pelo quociente entre o número de diagnósticos verdadeiramente positivos, face ao total de diagnósticos dados como positivos pelo método, corretos ou não (falsos positivos). O “Valor Preditivo Negativo” é dado pelo quociente entre o número de diagnósticos verdadeiramente negativos, face ao total de diagnósticos dados como negativos pelo método, corretos ou não (falsos negativos).

3. Resultados

3.1. ANOVA e Grupos Homogêneos

Foi realizada uma análise estatística descritiva das nove variáveis comportamentais estudadas, de acordo com as diferentes condições experimentais, através da análise de variância (ANOVA) e do *Turkey Honest Significance Test*, para pesquisa de Grupos Homogêneos (*Post-Hoc*). Os resultados dos valores médios e desvios-padrão das diferentes variáveis estudadas são apresentados nas Tabelas 2 a 5, por condição experimental.

Tabela 2 - Valores médios e desvios-padrão das variáveis coordenada X (mm) e coordenada Y (mm), nas condições experimentais Controlo, Lixívia, Lindano, TBE, Mercúrio e Formol. Os valores médios a vermelho são significativamente inferiores aos registados no controlo, os valores médios a verde são significativamente superiores aos registados no controlo ($\alpha < 0,05$).

Condição Experimental	Coordenada X média (mm)	Coordenada X - desvio padrão	Coordenada Y média (mm)	Coordenada Y - desvio padrão
Controlo	86,00	24,81	45,38	14,09
Lixívia	71,07	27,02	47,35	15,41
Lindano	72,45	23,57	45,63	14,55
TBE	75,50	30,57	40,64	15,24
Mercúrio	73,94	30,22	45,54	16,33
Formol	80,68	24,82	42,98	14,16

Tabela 3 - Valores médios e desvios-padrão das variáveis velocidade linear (mm/s) e velocidade angular (graus/s), nas condições experimentais Controlo, Lixívia, Lindano, TBE, Mercúrio e Formol. Os valores médios a vermelho são significativamente inferiores aos registados no controlo, os valores médios a verde são significativamente superiores aos registados no controlo ($\alpha < 0,05$).

Condição Experimental	Velocidade linear média (mm/s)	Velocidade linear - desvio padrão	Velocidade angular média (graus/s)	Velocidade angular desvio padrão
Controlo	35,24	26,02	220,77	119,05
Lixívia	51,63	31,59	221,74	101,77
Lindano	46,12	26,52	200,64	103,56
TBE	42,69	25,91	213,45	120,53
Mercúrio	48,28	24,70	237,05	111,25
Formol	36,46	23,81	201,48	96,17

Tabela 4 - Valores médios e desvios-padrão das variáveis aceleração linear (mm/s²) e aceleração angular (graus/s²), nas condições experimentais Controlo, Lixívia, Lindano, TBE, Mercúrio e Formol. Os valores médios a vermelho são significativamente inferiores aos registados no controlo, os valores médios a verde são significativamente superiores aos registados no controlo ($\alpha < 0,05$).

Condição Experimental	Aceleração linear média (mm/s ²)	Aceleração linear - desvio padrão	Aceleração angular média (graus/s ²)	Aceleração angular desvio padrão
Controlo	101,90	76,05	1024,21	542,23
Lixívia	147,41	95,89	1155,20	529,52
Lindano	136,20	85,77	1048,36	520,77
TBE	124,09	79,12	1094,36	610,74
Mercúrio	142,98	80,90	1232,59	501,61
Formol	103,37	72,64	1004,62	500,88

Tabela 5 - Valores médios e desvios-padrão das variáveis dispersão (raiz quadrada do produto dos desvios padrão X Y), ângulo entre os segmentos formados pelas coordenadas do peixe em três frames sucessivos e *meander* absoluto nas condições experimentais Controlo, Lixívia, Lindano, TBE, Mercúrio e Formol. Os valores médios a vermelho são significativamente inferiores aos registados no controlo, os valores médios a verde são significativamente superiores aos registados no controlo ($\alpha < 0,05$).

Condição Experimental	Dispersão média	Dispersão desvio padrão	Ângulo médio	Ângulo desvio padrão	Meander médio	Meander desvio padrão
Controlo	15,64	10,12	-1,28	10,53	30,69	47,51
Lixívia	17,19	8,76	-0,14	11,78	16,66	36,10
Lindano	17,05	8,51	0,47	11,74	16,08	31,96
TBE	15,67	9,08	-1,21	13,14	22,06	47,95
Mercúrio	17,59	8,87	2,90	14,03	17,15	33,95
Formol	13,80	8,17	-0,08	10,89	22,34	35,60

O *Turkey Honest Significance Test* permite encontrar valores significativamente diferentes entre si, dado que procura identificar diferenças entre médias que sejam superiores às esperadas devido ao desvio padrão, formando um ou mais grupos de resultados, de acordo com a significância das diferenças encontradas. Este teste foi escolhido por apresentar o menor número de grupos formados. Os resultados dos grupos homogêneos formados são apresentados no Anexo 1 (Tabelas 1 a 9).

3.2. Cluster Analysis

Para a *Cluster Analysis* utilizaram-se os dados referentes ao período compreendido entre o minuto 15 e o minuto 45, de todos os vídeos, evitando desta forma possíveis interferências nos minutos iniciais e finais das gravações. As *frames* compreendidas nesse período foram numeradas de 1 a 8, em séries sucessivas, e selecionadas somente as número 1. A necessidade de redução do número de fotogramas analisados deve-se ao limite de dados, imposto pelo programa *Statistica* (cerca de 1.500.000 de linhas).

O objetivo da *Cluster Analysis* é definir diferentes classes de comportamento, com base nas características do movimento analisadas, sem recurso a qualquer informação sobre as condições experimentais, agrupando os dados consoante a sua semelhança. Por outras palavras, cada *frame* foi analisada e inserida numa categoria, de acordo com as características das variáveis estudadas, sendo depois cada condição experimental definida pela frequência de cada uma dessas categorias. Os valores das diferentes variáveis estudadas não são valores instantâneos, mas a média dos valores presentes nessa *frame* e nas 63 anteriores, aumentando desta forma a resolução da análise.

De uma forma geral, como os dados analisados foram variáveis comportamentais, as categorias criadas serviram para caracterizar o comportamento dos organismos. No final, cada condição experimental foi representada pelas frequências dos diferentes tipos de comportamentos que apresentava.

Com base em ensaios anteriores, os parâmetros da análise foram ajustados, nomeadamente:

1. Dimensões: 3x3 = 9 categorias.
2. *Learning rates*: 0,01 *start*, 0,0001 *end*.
3. *Neighborhoods*: 2 *star*, 0 *end*.
4. Variáveis: média das 64 *frames* anteriores.
5. *Random sampling method*: *Train* – 34%, *Test* – 33%, *Validation* = 33%.
6. *Training cycle*: 1000.
7. *Network randomization*: normal.

Os restantes parâmetros foram os indicados por defeito pelo programa.

Em primeiro lugar foi testado o erro do modelo, de forma a garantir que a rede neuronal era adequada ao estudo.

Tabela 6 - *Statistica Error Test*. Teste ao erro de cada uma das séries temporais criadas pela Cluster, nomeadamente a série Treino, Teste e Validação.

Summary of active networks (Ensaio João 2014 Statistica 1)					
Index	Net. name	Training error	Test error	Validation error	Training algorithm
2	SOFM 9-9	0,084677	0,084282	0,083968	Kohonen 1000

Verificando-se que todas as séries temporais apresentavam uma taxa de erro bastante baixa (Tabela 6), cerca de 8%, aceitou-se que o modelo se adequava aos resultados.

O modelo foi ajustado para comportar nove dimensões, ou seja, criou nove categorias de dados e agrupou-os segundo as suas semelhanças. No Anexo 2 pode ver-se um resumo das categorias criadas, o valor médio e o desvio padrão das nove variáveis que as constituem.

Na Figura 1, pode ver-se a importância dada a cada variável na definição das categorias. Por exemplo, a variável coordenada X (mm) foi extremamente importante na definição da categoria (1,2) mas pouco significativa para a categoria (3,2).

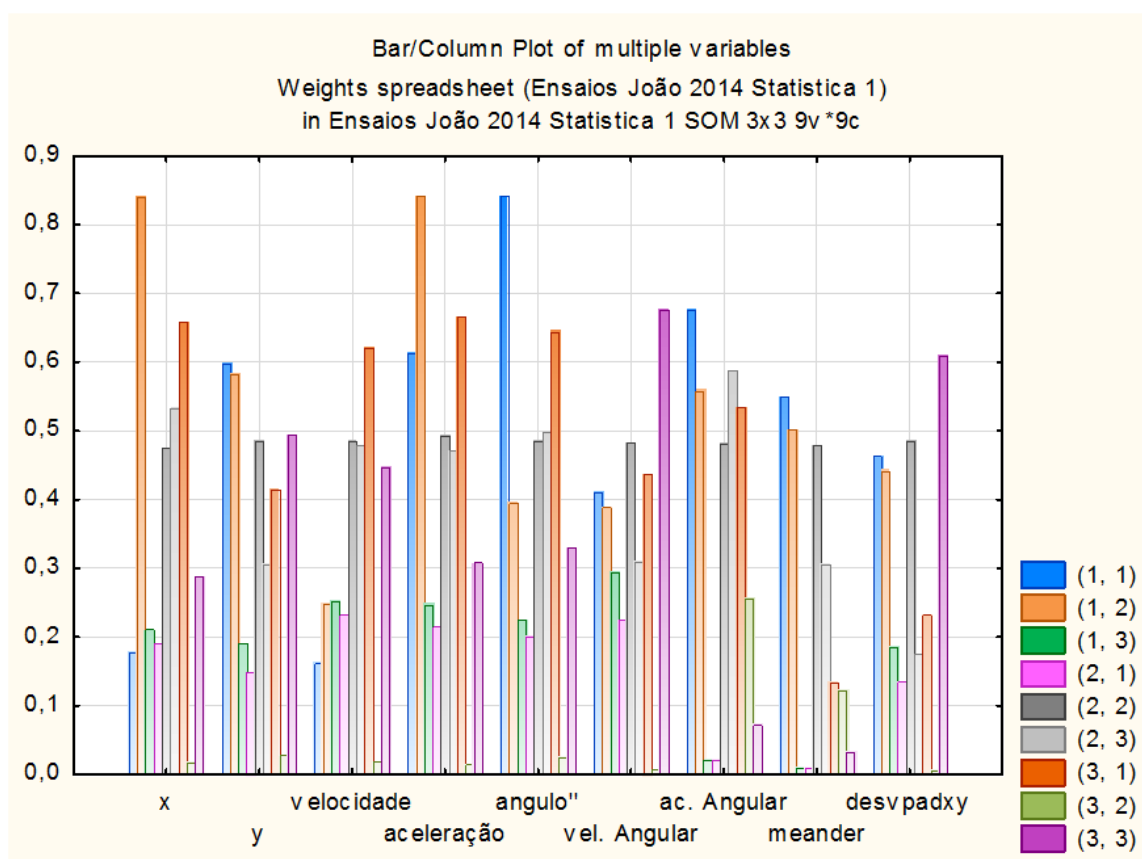


Figura 6 - Statistica Weights Spreadsheet: Resumo da importância de cada uma das variáveis (coordenada X, coordenada Y, velocidade linear, aceleração linear, ângulo entre os segmentos formados pelas coordenadas do peixe em três frames sucessivos, velocidade angular, aceleração angular, *meander* absoluto e dispersão) na definição das nove categorias criadas pela *Cluster Analysis*.

3.3. Análise de Correspondência

Realizou-se uma Análise de Correspondência que aliada ao teste do X^2 permitiu compreender que variáveis ou conjugação de variáveis foram importantes para o diagnóstico, isto é, que categorias de comportamento se constituíram mais informativas em cada condição experimental e quais foram as mais afetadas pela presença ou ausência de contaminante.

Através da análise da Figura 2, pode ver-se que alguns tipos de comportamentos puderam ser associados a uma dada condição experimental, por exemplo: um aumento da frequência da categoria (3,1) estava relacionado com a ausência de toxicidade. De forma contrastante, o aumento da frequência da categoria (1,3) estava relacionado com a presença de toxicidade. Isto significa que a condição experimental “Controlo” apresentou uma elevada frequência da categoria (3,1) e reduzida frequência da categoria (1,3).

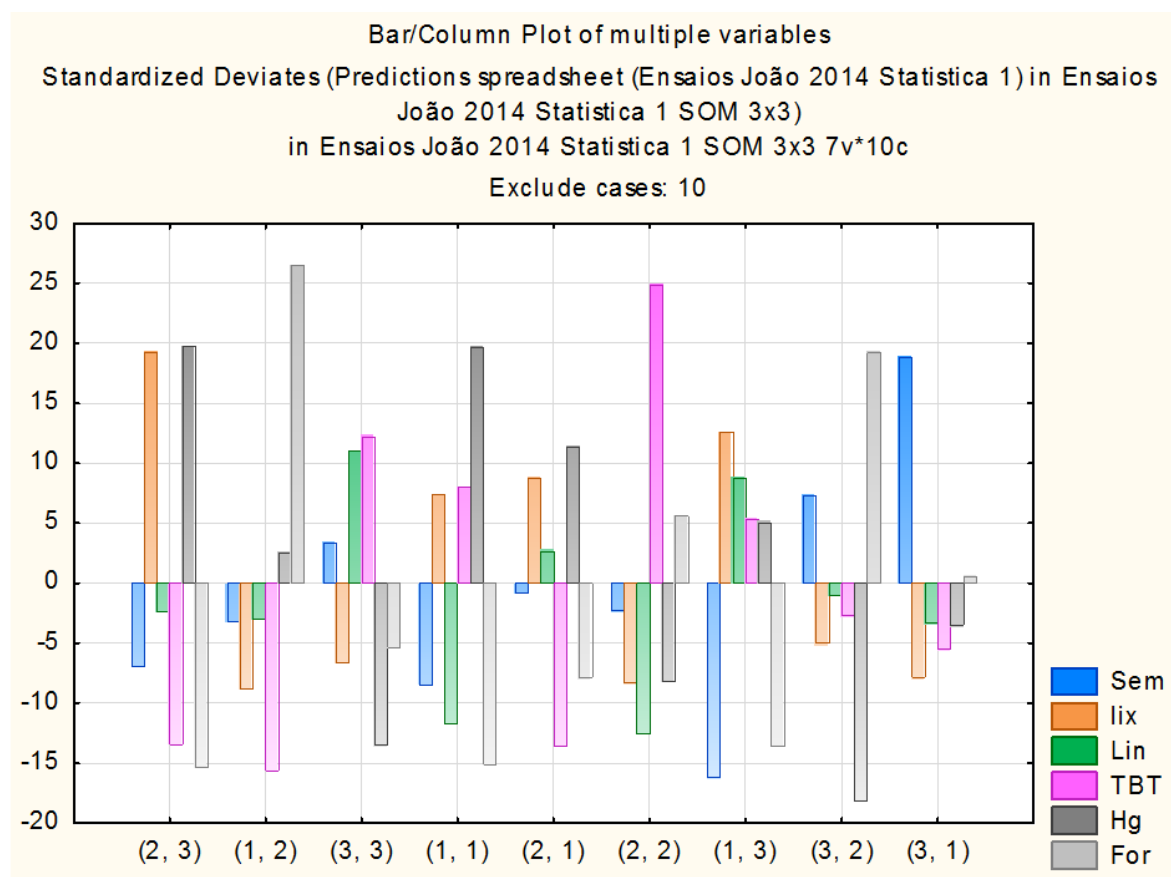


Figura 7 - *Statistica Standardized Deviates*: Resumo do desvio da frequência entre os valores observados e valores esperados, em cada uma das condições experimentais, nomeadamente: Controlo (Sem), Lixívia (lix), Lindano (Lin), TBE, Mercúrio (Hg) e Formol (For).

O Teste do X^2 (Tabela 7 – *Chi Squares*) demonstrou a existência diferenças significativas entre as diferentes condições experimentais.

Tabela 7 – *Statistica Eigenvalues and Inertia for all Dimensions*: Valores próprios e estatísticas relacionadas.

Number of Dims.	Eigenvalues and Inertia for all Dimensions (Predictions spreadsheet (Ensaio João 2014 Statistica 1) in Ensaio João 2014 Statistica 1 SOM 3x3) Input Table (Rows x Columns): 9 x 6 Total Inertia=,14250 Chi²=7151,4 df=40 p≈0,0000 Include condition: Momento="+" and (Sample="Train" or Sample="Test")				
	Singular Values	Eigen-Values	Perc. of Inertia	Cumulatv Percent	Chi Squares
1	0,275196	0,075733	53,14438	53,1444	3800,578
2	0,191097	0,036518	25,62589	78,7703	1832,615
3	0,127466	0,016248	11,40145	90,1717	815,366
4	0,107702	0,011600	8,13994	98,3117	582,122
5	0,049050	0,002406	1,68833	100,0000	120,740

Dado que o valor de significância foi inferior a 0,05% ($p \approx 0,0000$), foi possível afirmar que existiram, de facto, diferenças de comportamento estatisticamente significativas entre as condições experimentais.

A Análise de Correspondência foi feita sem as *frames* correspondentes à série de validação previamente definida pela *Cluster* e sem o momento “Antes”. A primeira exclusão, permitiu ao modelo trabalhar “às cegas”, não utilizando os dados que mais tarde seriam utilizados para a validação do método de diagnóstico. A segunda exclusão, representa uma vantagem na deteção de contaminação em situações reais, dado que não é necessário definir-se previamente um comportamento de referência sem tóxico para cada peixe que se utilize na monitorização, ou seja, não é necessário que cada peixe seja usado como controlo de si próprio.

Neste caso, a Análise de Correspondência criou um espaço penta dimensional, dado que o número de dimensões é calculado pela fórmula: n° de condições experimentais - 1. Neste espaço são definidos cinco vetores (1. Vetor Lixívia, 2. Vetor Lindano, 3. Vetor TBE, 4. Vetor Mercúrio, 5. Vetor Formol) que representam o efeito da adição dos tóxicos,

e que são calculados pela diferença entre o ponto “Sem Tóxico” e os pontos “Lix”, “Lin”, “TBE”, “Mer” e “For”. Estes pontos representam o conjunto das unidades experimentais com o respetivo contaminante.

Para realizar o diagnóstico, as amostras do momento “Depois” da série de validação foram projetadas como pontos suplementares no espaço penta dimensional definido pela Análise de Correspondência; e calculada a distância escalar dessas amostras a cada um dos Vetores Tóxico definidos previamente. Cada amostra é um ponto que representa a média das duas réplicas (por condição experimental), presentes nos nove ensaios. As distâncias calculadas medem o grau de alteração verificado em cada amostra, no sentido e direção dos cinco Vetores Tóxico. De forma a cada vetor ter o mesmo peso, os valores foram padronizadas através da média e do desvio-padrão das amostras.

Por cada amostra obtiveram-se cinco estimativas diferentes do grau de alteração verificado, que representam a distância escalar aos cinco Vetores Tóxicos. Cada uma serviu para diagnosticar separadamente a presença ou ausência de contaminação na água. O diagnóstico geral e indiferenciado foi dado por estas cinco distâncias escalares, sendo *positivo*, se for positivo em pelo menos uma medida deste grupo, *negativo*, se for negativo em todas essas medidas, e *incerto*, se for incerto em todas elas. O diagnóstico foi efetuado dividindo os Vetores Tóxicos em três segmentos. As amostras projetadas no segmento inferior, foram diagnosticadas como não apresentando tóxico, as amostras projetadas no segmento superior, foram diagnosticadas como apresentando tóxico, e as amostras projetadas no segmento intermédio, foram diagnosticadas como incertas. Estes pontos de corte nos segmentos podem ser afinados, de forma a melhorar os parâmetros de diagnóstico.

Todos os diagnósticos foram feitos por par de réplica, de modo a diminuir o grau de incerteza dos mesmos. Foram excluídos dois diagnósticos, uma vez que os peixes saltaram para o exterior da arena de filmagem, numa das unidades dos pares de réplicas.

Os resultados dos diagnósticos são apresentados na Tabela 8, em valores absolutos.

Tabela 8 – Resultados dos diagnósticos: Número de diagnósticos verdadeiro positivo, verdadeiro negativo, falso positivo, falso negativo e incerto, por condição experimental, nomeadamente: Lixívia, Lindano, TBE, Mercúrio e Formol. Os valores apresentados são valores absolutos.

Diagnóstico	Lixívia	Lindano	TBE	Mercúrio	Formol	Geral
Verdadeiro Positivo	6	6	8	7	7	34
Verdeiro Negativo	7	7	7	7	7	7
Falso Positivo	1	1	1	1	1	1
Falso Negativo	0	2	0	2	1	5
Incerto	3	0	1	0	1	5
Total	17	16	17	17	17	52

Foram calculados os valores de exatidão, sensibilidade, especificidade, VPP e VPN (Tabela 9), necessários na validação de qualquer instrumento de diagnóstico e importantes para comprovar o sucesso ou fracasso do modelo. É importante referir que, para o cálculo dos valores de qualidade de diagnóstico por contaminante, só foram contabilizados os oito brancos e as condições experimentais do composto correspondente. Procedeu-se como se cada um deles tivesse sido testado independentemente, no entanto os controlos negativos usados como termo de comparação foram os mesmos em todas as análises.

Tabela 9 – Resultados da qualidade do diagnóstico: Valores de exatidão, sensibilidade, especificidade, VPP e VPN por condição experimental, nomeadamente: Lixívia, Lindano, TBE, Mercúrio e Formol. Os valores apresentados encontram-se em unidades percentuais.

Qualidade de diagnóstico	Lixívia	Lindano	TBE	Mercúrio	Formol	Geral
Exatidão	76	81	88	82	82	79
Sensibilidade	66	75	88	77	77	77
Especificidade	88	88	88	88	88	88
Valor Preditivo Positivo	86	86	89	88	88	97
Valor Preditivo Negativo	100	78	100	78	88	58

Nos diagnósticos gerais positivos (certos e errados), e apenas para estes, procurou-se estimar o contaminante que supostamente estaria a causar a perturbação detetada (Tabela 10).

Tabela 10 – Resultados da identificação dada pelas medidas das distâncias escalares, por condição experimental, nomeadamente: Lixívia, Lindano, TBE, Mercúrio e Formol. Os valores apresentados são valores absolutos.

Identificação	Lixívia	Lindano	TBE	Mercúrio	Formol	Geral
Correta	1	3	4	2	4	14
Incorreta	2	5	5	3	6	21
Total	3	8	8	5	10	35

Esta identificação foi feita por intermédio das medidas das distâncias escalares calculadas anteriormente. A identificação do contaminante foi dada pela medida que entre

todas apresentasse o valor mais elevado. Dos cinquenta e dois diagnósticos realizados, trinta e cinco foram diagnosticados pelo modelo como contendo tóxico. Desses diagnósticos gerais positivos, catorze foram corretamente identificados, sendo que os restantes vinte e um foram incorretamente identificados. Por exemplo, a presença de Lixívia foi identificada três vezes pelo método, sendo que uma identificação estava correta e as restantes não.

4. Discussão

O presente estudo teve como principal objetivo testar a capacidade de diagnóstico de um sistema de vídeo rastreio e confrontá-lo com cinco tóxicos distintos, de forma a garantir a sua fiabilidade. Adicionalmente foi possível obter informações importantes, nomeadamente de que forma o comportamento do Peixe Zebra é alterado quando exposto a estes contaminantes. Esta informação pode revelar-se essencial, não só para este como para outros trabalhos, porque permite ter uma perspetiva sobre os efeitos que estes contaminantes possam ter sobre as comunidades biológicas aquáticas. Apesar de se ter analisado apenas uma imagem bidimensional do espaço, a escolha acertada das variáveis e a relação direta destas com a atividade dos peixes tornou possível identificar os comportamentos típicos das diferentes condições experimentais.

De uma forma geral, e salvo algumas exceções, as diferentes condições experimentais com a presença de contaminação apresentaram diferenças estatisticamente significativas nas nove variáveis analisadas, quando comparadas com o controlo.

Em primeiro lugar, a análise das coordenadas médias X e Y (Tabela 2) permitiu obter uma imagem geral da posição média do peixe na arena. Uma vez que cada uma delas tinha 175 mm de comprimento e 100 mm de largura, o ponto médio é dado pelas coordenadas $x = 88$ e $y = 50$. No caso da coordenada Y, a relação não foi tão evidente, mas quando analisada a coordenada X, foi possível verificar que todas as condições apresentaram diferenças estatisticamente significativas entre si (Anexos 1, Tabela 1 e 2). O controlo apresentou o valor médio de X (86 mm) mais próximo do centro deste eixo (88 mm), o que significa que em média os peixes nesta condição se encontravam muito perto do centro do eixo. Já nas condições com tóxico, os peixes apresentaram uma posição média menos centrada, mas ainda longe dos limites do eixo ($x = 0$ e $x = 175$). Na presença de Formaldeído ($x = 80,68$ mm) verificou-se a menor diferença em relação ao controlo, enquanto a presença de Lixívia ($x = 71,07$ mm) apresentou a maior variação. Os resultados parecem indicar que a exposição a estes contaminantes aumenta o comportamento de fuga, dado que os animais apresentaram maior tendência para se afastar do centro da arena e procurar zonas mais periféricas. Este comportamento é considerado uma resposta adaptativa e é utilizado como estratégia para facilitar a procura de abrigo, proteção ou vias de fuga a predadores (Ahmad e Richardson, 2013). É frequentemente observado quando os animais são sujeitos a condições de *stress*, como no caso de habituação a novos ambientes (Sharma *et al.*, 2009).

Em relação à velocidade (mm/s) e aceleração (mm/s²) linear médias (Tabelas 3 e 4), foi possível verificar que todas as condições experimentais com tóxico apresentaram valores mais elevados que o controlo (35,24 mm/s e 101,90 mm/s², respetivamente), tendo o Formaldeído apresentado os valores mais semelhantes à condição sem tóxico, sendo a diferença estatisticamente significativa no caso da velocidade (36,46 mm/s), mas não no caso da aceleração (103,37 mm/s²). Mais uma vez, a Lixívia (51,63 mm/s e 147,41 mm/s²) apresentou a maior variação em relação ao controlo. Este aumento de velocidade e aceleração (aumento da atividade natatória), quando exposto a contaminantes pode parecer contraditório, no entanto as respostas comportamentais dos organismos podem não apresentar uma relação de proporcionalidade direta com a concentração de tóxico presente. Isto é, baixas concentrações podem ser responsáveis pelo aumento de determinadas características, como a velocidade ou aceleração, enquanto concentrações mais elevadas podem ser responsáveis pela diminuição das mesmas (Little *et al.*, 1990; Little e Finger, 1990). Os resultados deste trabalho estiveram de acordo aos obtidos em 2007 por Magalhães *et al.* que verificaram um aumento da distância percorrida por *Danio rerio* exposto a Lixívia durante cinco horas, distância esta que foi diminuindo de forma progressiva com o aumento da concentração da contaminação. É importante referir que a concentração mínima utilizada pelos autores acima referidos (4,8 mg/L) foi cerca de dez vezes superior e que o tempo de exposição foi cinco vezes superior ao do presente estudo, o que demonstra a grande sensibilidade por parte do sistema de vídeo rastreio desenvolvido neste trabalho.

Para os restantes parâmetros menos clássicos a bibliografia não é extensiva e os termos de comparação foram difíceis de obter.

No caso da velocidade angular (graus/s) média (Tabela 3), existiram resultados estatisticamente significativos acima e abaixo dos verificados no controlo. Este parâmetro indica o grau de curvatura por unidade de tempo, ou seja a velocidade de rotação dos animais. A Lixívia (221,74 graus/s) apresentou o valor mais próximo do controlo (220,77 graus/s), não sendo a diferença estatisticamente significativa. O Mercúrio (237,05 graus/s) apresentou o valor mais elevado e as condições Lindano (200,64 graus/s), Formaldeído (201,48 graus/s) e TBE (213,45 graus/s) apresentaram os valores médios mais baixos.

No que diz respeito à aceleração angular (graus/s²) média (Tabela 4), o controlo apresentou o valor de 1024,21 graus/s², sendo que todos os restantes valores foram significativamente superiores, com exceção do Formaldeído (1004,62 graus/s²). Este parâmetro indica a aceleração de rotação dos animais.

No caso do valor da dispersão (Tabela 5), dado pela raiz quadrada do produto dos desvios padrão $X \cdot Y$, o Formaldeído (13,80) surgiu mais uma vez como a única exceção, apresentando o único valor inferior ao controlo (15,64). As restantes condições experimentais apresentaram valores superiores, no entanto, apenas no caso do TBE (15,67) as diferenças não foram estatisticamente significativas. Este parâmetro é bastante útil na caracterização do comportamento porque dá uma ideia geral acerca da atividade natatória dos peixes, sendo que valores mais baixos indicam menor atividade e valores mais altos uma maior dispersão pelo aquário.

A análise dos valores do ângulo entre os segmentos formados pelas coordenadas do peixe em três *frames* sucessivas (Tabela 5) revelou-se bastante interessante, por ter permitido perceber a orientação de rotação dos peixes. No caso dos valores negativos, as rotações foram feitas maioritariamente para o lado esquerdo, sendo que no caso de valores positivos verificou-se o oposto. Com exceção do TBE (-1,21°) todos os valores foram significativamente diferentes dos do controlo (-1,28°). Ao contrário de todas as outras condições, no caso do Lindano (0,47°) e do Mercúrio (2,90°) as rotações observadas verificaram-se maioritariamente para a direita.

Por fim, no que diz respeito ao valor médio do *meander* absoluto (Tabela 5), o controlo (30,69 graus/mm) apresentou o valor mais elevado, enquanto as condições experimentais com tóxico obtiveram valores mais reduzidos e estatisticamente significativos. O Lindano (16,08 graus/mm) apresentou a maior variação em relação ao controlo e o Formol a menor variação (22,34 graus/mm). Este valor indica o grau de curvatura por unidade de deslocação (graus/mm), como tal, pode-se inferir que todos os peixes nas condições experimentais sujeitas a contaminação apresentaram um perfil de deslocação com uma trajetória menos acentuada, isto é, com menor curvatura.

De uma forma geral, as condições com tóxico apresentaram um aumento de atividade natatória dos peixes em relação ao controlo. Esta observação é corroborada principalmente pela análise dos valores de velocidade linear média, dado que as condições com contaminantes apresentaram sempre valores significativamente superiores aos registados no controlo. Os valores de aceleração linear e angular média e dispersão vão também, de um modo geral, de encontro a esta observação. Este aumento de atividade natatória pode ser explicado pelo instinto de fuga presente nos animais, que tentam desta forma evitar a exposição aos agentes tóxicos (Magalhães *et al.*, 2007). Esta capacidade de resistência pode indicar que os organismos estão perto do limite de exposição tolerável para o agente em questão, mas ainda dentro dos valores de NOAEC (Magalhães *et al.*, 2007).

Neste estudo, a única exceção verificou-se em relação ao Formaldeído. Nesta condição, não só os valores de velocidade e aceleração linear média são os mais semelhantes ao controlo, como também os valores de aceleração angular e dispersão são significativamente inferiores à condição sem contaminação. Particularmente através da observação do valor de dispersão média, pode-se verificar que os peixes expostos ao Formaldeído apresentaram uma diminuição da atividade natatória em relação ao controlo.

De facto, estas observações vão de encontro aos resultados obtidos em 2012 por Varusai *et al.* que revelaram que *D. rerio* exposto a uma concentração de 40 mg/L de Formaldeído apresenta perda de equilíbrio, secreção de muco e diminuição progressiva do consumo de oxigénio e atividade. A concentração utilizada neste trabalho não revelou ser suficiente para causar mortalidade nos organismos, mas parece ter sido suficiente para implicar custos metabólicos significativos, provavelmente devido à capacidade do Formaldeído em danificar os tecidos epiteliais das brânquias e dificultar os processos de hematose branquial (Varusai *et al.*, 2012). A diminuição da atividade natatória pode ser relacionada com o instinto de “evitamento” (*avoidance behavior*) presente nos animais, que tentam desta forma diminuir os custos metabólicos e possíveis efeitos tóxicos, resultantes da exposição a contaminantes (Schreck *et al.*, 1997; Halappa e David, 2009). Esta diminuição dos gastos energéticos quando sujeitos a condições de toxicidade aumenta a probabilidade de sobrevivência e pode indicar que os níveis de exposição já se encontravam dentro dos valores de LOAEC (Magalhães *et al.*, 2007).

Um aspeto interessante que deve ser referido é o facto dos valores de *meander* absoluto parecerem, à primeira vista, uma contradição. Neste estudo, os peixes na condição experimental controlo apresentaram os valores mais elevados de *meander*, indicando um perfil de deslocação mais acentuado que os animais sujeitos a contaminação, o que parece ir contra as observações referidas anteriormente. No entanto, tendo em conta a fórmula matemática que descreve esta variável: razão entre o ângulo absoluto e a distância percorrida; é possível perceber que maiores velocidades de deslocação (maior distância percorrida no mesmo espaço temporal) levam a uma diminuição do valor de *meander* absoluto, por apresentarem uma relação de proporcionalidade inversa. Por outras palavras, um peixe que se desloque a uma velocidade superior (estimulado pela presença de contaminação) não vai ser capaz de realizar mudanças de direção tão pronunciadas, o que resulta num perfil de deslocação menos acentuado. Fenómeno análogo foi também observado num estudo realizado por Liu *et al.*, (2012). Nesse estudo, utilizando uma rede neuronal do tipo SOM (o mesmo tipo utilizado neste trabalho) foi possível caracterizar-se o movimento de *Daphnia magna* exposto a cobre. Os organismos quando sujeitos a este metal evidenciaram uma diminuição da velocidade linear, aumento do valor de *meander* e

do número de rotações por segundo, relativamente aos organismos não expostos. Esta relação de proporcionalidade inversa entre a velocidade e o valor de *meander* vai de encontro aos resultados obtidos neste trabalho.

Em relação ao objetivo principal do estudo, os resultados dos valores gerais da capacidade de diagnóstico foram: 79% de exatidão, 77% de sensibilidade, 88% de especificidade (Tabela 9). Segundo recomendações publicadas pelo Centro Europeu de Validação de Métodos Alternativos (*European Centre for the Validation of Alternative Methods*) (Genschow *et al.*, 2002), no qual se considerara que resultados preditivos entre 65 e 74% são “Suficientes”, 75 a 84% são “Bons”, e iguais ou superiores a 85% são “Excelentes”, a capacidade preditiva por tóxico deste trabalho encontrou-se entre o nível “Bom” e o nível “Excelente”, com valores a variar entre os 78 e os 100% (Tabela 9).

No que diz respeito aos valores de “Exatidão”, o sistema foi capaz de diagnosticar corretamente a presença ou ausência de toxicidade em 79% dos casos (Tabela 9), o que significa que cerca de 8 em cada 10 dez diagnósticos estavam corretos. A Lixívia apresentou a menor percentagem de diagnósticos corretos (76%), enquanto o TBE apresentou os melhores resultados (88%).

No caso da “Sensibilidade”, o sistema foi capaz de diagnosticar corretamente a presença de toxicidade em 77% dos casos (Tabela 9). Mais uma vez a Lixívia apresentou os menores resultados (66%), enquanto o TBE apresentou os melhores valores (88%). No caso da Lixívia, a percentagem de sucesso reduzida pode ser explicada pelo facto de existirem três diagnósticos incertos.

Neste estudo, o valor de “Especificidade” foi bastante positivo e igual para todas as condições (88%) (Tabela 9), dado que os “brancos” utilizados foram sempre os mesmos. Como houve apenas um diagnóstico falso positivo em todo o universo de resultados, a percentagem de sucesso foi extremamente elevada.

As grandes diferenças dos valores de qualidade de diagnóstico nos parâmetros VPP e VPN (Tabela 9), entre o diagnóstico geral e os diagnósticos por tóxico, devem-se ao facto de os brancos terem sido os mesmos em ambos os casos (Tabela 8). Por consequência, os números de diagnósticos verdadeiros negativos e falsos positivos foram sempre os mesmos em qualquer dos casos. Isto explica a razão de o valor de VPN ser relativamente baixo no diagnóstico geral (58%), mas bastante elevado nos diagnósticos por tóxico. O número de verdadeiros negativos foi igual em todos os diagnósticos (sete), mas os cinco falsos negativos do diagnóstico geral foram distribuídos pelos diferentes diagnósticos por tóxico. O mesmo se verificou relativamente aos valores de VPP, mas de modo inverso, dado que o número de falsos positivos (um) foi igual em todos os diagnósticos, mas os

trinta e quatro verdadeiros positivos do diagnóstico geral foram distribuídos pelos diferentes diagnósticos por tóxico. Por este motivo, estes dois parâmetros não devem ser avaliados de uma forma geral, mas sim tóxico a tóxico. No que diz respeito ao valor de VPP, todos os resultados encontraram-se no nível “Excelente”, variando entre os 86% (Lixívia e Lindano) e os 89% (TBE). No caso do valor de VPN, os resultados encontraram-se entre os níveis “Bom” e “Excelente”, variando entre os 78% (Lindano e Mercúrio) e os 100% (Lixívia e TBE).

Apesar de não ser o principal objetivo deste trabalho, o sistema foi capaz de identificar corretamente o agente responsável pela contaminação em 40% dos casos (Tabela 10). Este valor pode não parecer significativo, mas o facto de o sistema ter sido capaz de indicar qual o tóxico presente no meio, mesmo não tendo sido desenvolvido especificamente com esse objetivo, demonstra o enorme potencial deste tipo de tecnologias. Tanto quanto é do conhecimento do grupo de trabalho, onde este projeto se inseriu, existem outros autores que procuram confrontar sistemas de vídeo rastreio com múltiplos tóxicos (Richards *et al.*, 2008; Winter *et al.*, 2008) mas nenhum que procure identificar o agente responsável pela perturbação, como tal, esta capacidade deve ser ressalvada como algo extremamente importante e inovador.

É importante relembrar que os diagnósticos não foram realizados por réplica mas por cada par de réplicas, de forma a se diminuir o grau de incerteza dos diagnósticos, mas que no entanto, este número deveria ser idealmente superior, de forma a garantir uma qualidade de diagnóstico também superior. Neste estudo, o número de réplicas foi diminuído para se poder testar, simultaneamente, o maior número possível de tóxicos diferentes. Tendo em atenção o reduzido número de réplicas usado, os níveis de qualidade de diagnósticos são bastante positivos, aproximando-se aos obtidos anteriormente pelo grupo de trabalho (trabalho para publicação), onde este projeto se inseriu, mesmo tendo-se reduzido o número de réplicas para a metade. Este facto pode ser explicado por dois fatores: devido ao *upgrade* do *hardware* utilizado, nomeadamente ao nível da qualidade de imagem; e devido ao facto de ter sido aplicada uma rede neuronal diferente (anteriormente *Probabilistic Neural Network*), podendo assim concluir-se que a rede neuronal SOM adequa-se melhor à metodologia aplicada.

Os valores de exatidão, sensibilidade, especificidade, VPP e VPN não puderam ser comparados com a maioria dos estudos publicados sobre vídeo rastreio de Peixe Zebra, dado que os mesmos se limitam a fazer análises de variância (*ANOVA*) e não apresentam valores sobre a eficácia de diagnóstico dos seus testes. Num estudo realizado por Winter *et al.*, 2008, em que foi avaliado o potencial toxicológico de vinte e cinco compostos em

larvas de Peixe Zebra, utilizando um sistema comercial de vídeo rastreio (*Viewpoint Videotrack for Zebrafish™*), a capacidade preditiva positiva média (VPP) foi de 72% enquanto a capacidade preditiva negativa média (VPN) foi de 63%. Estes valores, quando comparados com os piores resultados obtidos neste trabalho, de 86% para o VPP e 78% para o VPN, demonstram uma capacidade de diagnóstico inferior. Num outro trabalho, realizado por Richards *et al.*, 2008, a capacidade preditiva global (positiva e negativa) foi de 70%, a sensibilidade de 68% e a especificidade de 75%. Estes resultados foram obtidos utilizando um sistema comercial de vídeo rastreio (*Tracksys Tower Filming System*), expondo larvas de Peixe Zebra a vinte e sete compostos e testando os seus efeitos adversos na função visual dos organismos. Mais uma vez, os valores apresentados foram inferiores aos piores resultados obtidos neste trabalho: 82% de capacidade preditiva global, 77% de sensibilidade e 88% de especificidade.

É importante ressaltar que os trabalhos previamente referidos não utilizam o vídeo rastreio como ferramenta de alerta precoce de perturbações do meio aquático, mas sim como ferramenta no *screening* toxicológico. Como tal, o número de compostos testados foi superior aos realizados neste trabalho. Por outro lado, as concentrações foram geralmente bastante superiores às aqui testadas, representando resultados menos relevantes de um ponto de vista ecológico.

A comparação dos resultados deste trabalho com uma variedade de métodos de diagnóstico clínico humanos (Halkin *et al.*, 1998; Knottnerus *et al.*, 2002), onde o grau de exigência e escrutínio é por natureza bastante elevado, demonstrou que os valores de especificidade e sensibilidade aqui conseguidos encontraram-se sensivelmente a meio desta exigente tabela: cerca de metade dos métodos analisados (trinta e dois em sessenta e seis) apresentaram valores de especificidade iguais ou inferiores ao resultado geral deste trabalho (88%), enquanto cerca de três quintos dos métodos analisados (trinta e oito em sessenta e seis) apresentaram valores de sensibilidade iguais ou inferiores ao resultado geral aqui obtido (77%).

5. Conclusão

De uma forma geral, o Peixe Zebra apresentou dois tipos de comportamentos distintos quando exposto a contaminação. No caso da Lixívia, Lindano, TBE e Mercúrio observou-se o aumento de atividade natatória, que pode ser explicado pelo instinto de fuga presente nos animais que tentam, desta forma, evitar a exposição aos agentes tóxicos. No caso da exposição ao Formol, verificou-se uma diminuição da atividade natatória que pode ser relacionada com o instinto de “evitamento” presente nos animais que tentam, desta forma, diminuir os custos metabólicos e possíveis efeitos tóxicos, resultantes da exposição a este composto. Estes diferentes comportamentos podem estar relacionados com o facto da concentração e tempo de exposição utilizados se encontrarem dentro dos limites de LOEC, no caso da contaminação com Formol, mas não no caso dos restantes compostos, que se encontraram nos limites de NOEC. É importante referir que nenhum animal foi sacrificado no decorrer deste estudo.

O objetivo principal do trabalho foi plenamente conseguido, com uma capacidade de diagnóstico de 79% de exatidão, 77% de sensibilidade, 88% de especificidade. No que diz respeito ao valor de VPP, todos os resultados encontraram-se no nível “Excelente”, variando entre os 86% (Lixívia e Lindano) e os 89% (TBE). No caso do valor de VPN, os resultados encontraram-se entre os níveis “Bom” e “Excelente”, variando entre os 78% (Lindano e Mercúrio) e os 100% (Lixívia e TBE).

Em suma, a reduzida percentagem de diagnósticos incorretos (12%) e incertos (10%) foi um espelho da elevada capacidade de diagnóstico do sistema desenvolvido. O facto de terem sido utilizadas concentrações ecologicamente relevantes e bastante reduzidas (apenas 9% do CL_{50-96h}) bem como um tempo de exposição curto (uma hora) reforça ainda mais esse aspeto. A utilização de cinco tóxicos pertencentes a grupos químicos distintos veio comprovar a versatilidade do sistema, produzindo resultados bastante satisfatórios, mesmo quando confrontado com condições experimentais diferentes, indicando que pode ser aplicado como sistema de alerta precoce de perturbações do meio aquático. Fica assim demonstrado que o sistema possuiu um elevado espectro de ação na deteção de contaminantes na água, o objetivo principal deste trabalho. A utilização do vídeo rastreio de Peixe Zebra em conjunto com a Rede Neuronal Artificial SOM e Análise de Correspondência na deteção de contaminantes na água pode tornar-se uma poderosa ferramenta no combate à poluição aquática.

6. Referências Bibliográficas

1. Ahmad, F., Richardson, M. (2013). Exploratory behaviour in the open field test adapted for larval zebrafish: impact of environmental complexity. *Behavioural Processes* 92, 88-98.
2. Ankeny, R., Leonelli, S. (2011). What's so special about model organisms? *Studies in History and Philosophy of Science* 42, 313-323.
3. Antizar-Ladislao, B. (2008). Environmental levels, toxicity and human exposure to tributyltin (TBT)-contaminated marine environment. *Environment International* 34, 292-308.
4. Appeltans, W., Ahyong, S., Anderson, G., Angel, M., Artois, T., Bailly, N., Bamber, R., Barber, A., Bartsch, I., Berta, A., *et al.* (2012). The magnitude of global marine species diversity. *Current Biology* 22, 2189-2202.
5. Arambarri, I., Garcia, R., Millan, E. (2003). Assessment of tin and butyltin species in estuarine superficial sediments from Gipuzkoa, Spain. *Chemosphere* 51, 643-649.
6. Aranda-Anzaldo, A., Viza, D., Busnel, R. (1992). Chemical inactivation of human immunodeficiency virus in vitro. *Journal of Virological Methods* 37, 71-81.
7. Azizullah, A., Khattak, M., Richter, P., Häder, D. (2011). Water pollution in Pakistan and its impact on public health. *Environment International* 37, 479-497.
8. Barile, F. (2013). Principles of toxicology testing (Florida, USA: Taylor & Francis Group), 70-72.
9. Bayarri, S., Baldassarri, L., Iacovella, N., Ferrara, F., di Domenico, A. (2001). PCDDs, PCDFs, PCBs and DDE in edible marine species from the Adriatic Sea. *Chemosphere* 43, 601-610.
10. Bijoy-Nandan, S., Nimila, P. (2012). Lindane toxicity: histopathological, behavioural and biochemical changes in *Etroplus maculatus* (Bloch, 1795). *Marine Environmental Research* 76, 63-70.
11. Blaber, S. (1970). The occurrence of a penis-like outgrowth behind the right tentacle in spent females of *Nucella lapillus*. *Journal of Molluscan Studies* 39, 231-233.
12. Blaser, R., Gerlai, R. (2006). Behavioral phenotyping in zebrafish: comparison of three behavioral quantification methods. *Behavior Research Methods* 38, 456-469.

13. Blaser, R., Vira, D. (2014). Experiments on learning in zebrafish (*Danio rerio*): a promising model of neurocognitive function. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 42, 224-231.
14. Bouvier d'Yvoire, M., Bremer, S., Casati, S., Ceridono, M., Coecke, S., Corvi, R., Eskes, C., Gribaldo, L., Griesinger, C., Knaut, H., *et al.* (2012). ECVAM and new technologies for toxicity testing. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 745, 154-180.
15. Briz, V., Molina-Molina, J., Sanchez-Redondo, S., Fernandez, M., Grimalt, J., Olea, N., Rodriguez-Farre, E., Sunol, C. (2011). Differential estrogenic effects of the persistent organochlorine pesticides dieldrin, endosulfan, and lindane in primary neuronal cultures. *Toxicological Sciences* 120, 413-427.
16. Bushnell, P., Kavlock, R., Crofton, K., Weiss, B., Rice, D. (2010). Behavioral toxicology in the 21st century: challenges and opportunities for behavioral scientists. *Neurotoxicology and Teratology* 32, 313-328.
17. Cabanes, G. Bennani, Y. (2010). Learning the number of clusters in Self-Organizing Map. *Self-Organizing Maps*, (Shanghai, China: InTech) pp. 15-28.
18. Cabrera, C., Ortega, E., Lorenzo, M., Lopez, M. (1998). Cadmium contamination of vegetable crops, farmlands, and irrigation waters. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology* 154, 55-81.
19. Cambier, S., Benard, G., Mesmer-Dudons, N., Gonzalez, P., Rossignol, R., Brethes, D., Bourdineaud, J. (2009). At environmental doses, dietary methylmercury inhibits mitochondrial energy metabolism in skeletal muscles of the zebra fish (*Danio rerio*). *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 41, 791-799.
20. Chaplin, M. (2001). Water: its importance to life. *Biochemistry and Molecular Biology Education* 29, 54-59.
21. Cheng, B., Titterington, D., (1994). Neural networks: A review from a statistical perspective. *Statistical Science* 9, 2-54.
22. Clasen, T., Edmondson, P. (2006). Sodium dichloroisocyanurate (NaDCC) tablets as an alternative to sodium hypochlorite for the routine treatment of drinking water at the household level. *International Journal of Hygiene and Environmental Health* 209, 173-181.
23. Clotfelter, E., Bell, A., Levering, K. (2004). The role of animal behaviour in the study of endocrine-disrupting chemicals. *Animal Behaviour* 68, 665-676.
24. Costanza, R. (1999). The ecological, economic, and social importance of the oceans. *Ecological Economics* 31, 199-213.
25. Cruz, F., Leite, C., Pereira, T., Bogo, M., Bonan, C., Battastini, A., Campos, M., Morrone, F. (2013). Assessment of mercury chloride-induced toxicity and the

relevance of P2X7 receptor activation in zebrafish larvae. *Comparative Biochemistry and Physiology* 158, 159-164.

26. Davis, S. (2002). Lindane. *Environmental Quality Management* 12, 89-95.
27. Dowson, P., Bubb, J., Lester, J. (1996). Persistence and degradation pathways of tributyltin in freshwater and estuarine sediments. *Estuarine Coastal and Shelf Science* 42, 551-562.
28. Drobatz, K. (2009). Measures of accuracy and performance of diagnostic tests. *Journal of Veterinary Cardiology* 11 Suppl 1, 33-40.
29. Duong, A., Steinmaus, C., McHale, C., Vaughan, C., Zhang, L. (2011). Reproductive and developmental toxicity of formaldehyde: a systematic review. *Mutation Research* 728, 118-138.
30. Ensenbach, U., Nagel, R. (1995). Toxicity of complex chemical mixtures: acute and long-term effects on different life stages of zebrafish (*Brachydanio rerio*). *Ecotoxicology and Environmental Safety* 30, 151-157.
31. EPA (1998). Guidelines for ecological risk assessment (Washington DC, USA: U.S. Environmental Protection Agency), pp. 188.
32. Faucher, K., Fichet, D., Miramand, P., Lagardere, J. (2008). Impact of chronic cadmium exposure at environmental dose on escape behaviour in sea bass (*Dicentrarchus labrax*; Teleostei, Moronidae). *Environmental Pollution* 151, 148-157.
33. Fleeger, J., Carman, K., Nisbet, R. (2003). Indirect effects of contaminants in aquatic ecosystems. *The Science of the Total Environment* 317, 207-233.
34. Forbes, V., Forbes, T. (1994). *Ecotoxicology in theory and practice*, Vol XIV (London, UK: Chapman & Hall), 2-8.
35. Genschow, E., Spielmann, H., Scholz, G., Seiler, A., Brown, N., Piersma, A., Brady, M., Clemann, N., Huuskonen, H., Paillard, F., *et al.* (2002). The ECVAM international validation study on in vitro embryotoxicity tests: results of the definitive phase and evaluation of prediction models. *Alternatives to Laboratory Animals: ATLA* 30, 151-176.
36. Gerlai, R. (2003). Zebra fish: an uncharted behavior genetic model. *Behavior Genetics* 33, 461-468.
37. Gerlai, R., Fernandes, Y., Pereira, T. (2009). Zebrafish (*Danio rerio*) responds to the animated image of a predator: towards the development of an automated aversive task. *Behavioural Brain Research* 201, 318-324.
38. Gerlai, R., Lee, V., Blaser, R. (2006). Effects of acute and chronic ethanol exposure on the behavior of adult zebrafish (*Danio rerio*). *Pharmacology, Biochemistry and Behavior* 85, 752-761.

39. Geyer, H., Scheunert, I., Brüggemann, R., Langer, D., Korte, F., Kettrup, A., Mansour, M., Steinberg, C., Nyholm, N., Muir, D. (1997). Half-lives and bioconcentration of lindane (γ -HCH) in different fish species and relationship with their lipid content. *Chemosphere* 35, 343-351.
40. Grunwald, D., Eisen, J. (2002). Headwaters of the zebrafish - emergence of a new model vertebrate. *Nature Reviews Genetics* 3, 717-724.
41. Halappa, R., David, M. (2009). Behavioural responses of the freshwater fish, *Cyprinus carpio* (Linnaeus) following sublethal exposure to chlorpyrifos. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 9, 233-238.
42. Halkin, A., Reichman, J., Schwaber, M., Paltiel, O., Brezis, M. (1998). Likelihood ratios: getting diagnostic testing into perspective. *QJM: An International Journal of Medicine* 91, 247-258.
43. Harino, H., Yamamoto, Y., Eguchi, S., Kawai, S., Kurokawa, Y., Arai, T., Ohji, M., Okamura, H., Miyazaki, N. (2007). Concentrations of antifouling biocides in sediment and mussel samples collected from Otsuchi bay, Japan. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 52, 179-188.
44. Hellou, J. (2011). Behavioural ecotoxicology, an "early warning" signal to assess environmental quality. *Environmental Science and Pollution Research International* 18, 1-11.
45. Hidalgo, E., Bartolome, R., Dominguez, C. (2002). Cytotoxicity mechanisms of sodium hypochlorite in cultured human dermal fibroblasts and its bactericidal effectiveness. *Chemico-Biological Interactions* 139, 265-282.
46. Hohreiter, D., Rigg, D. (2001). Derivation of ambient water quality criteria for formaldehyde. *Chemosphere* 45, 471-486.
47. Humphreys, E., Janssen, S., Heil, A., Hiatt, P., Solomon, G., Miller, M. (2008). Outcomes of the California ban on pharmaceutical lindane: clinical and ecologic impacts. *Environmental Health Perspectives* 116, 297-302.
48. Islam, R., Lynch, J. (2012). Mechanism of action of the insecticides, lindane and fipronil, on glycine receptor chloride channels. *British Journal of Pharmacology* 165, 2707-2720.
49. Jung, S., Kim, J., Jeon, I., Lee, Y. (2001). Formaldehyde residues in formalin-treated olive flounder (*Paralichthys olivaceus*), black rockfish (*Sebastes schlegelii*), and seawater. *Aquaculture* 194, 253-262.
50. Kane, A., Salierno, J., Gipson, G., Molteno, T., Hunter, C. (2004). A video-based movement analysis system to quantify behavioral stress responses of fish. *Water Research* 38, 3993-4001.
51. Kasting, J. (1993). Earth's early atmosphere. *Science* 259, 920-926.

52. Knottnerus, J., van Weel, C., Muris, J. (2002). Evaluation of diagnostic procedures. *BMJ (Clinical research ed)* 324, 477-480.
53. Kohonen, T. (2001). *Self-organizing maps*, 3rd Edition (New York, USA: Springer-Verlag), pp. 501.
54. Korbas, M., Macdonald, T., Pickering, I., George, G., Krone, P. (2012). Chemical form matters: differential accumulation of mercury following inorganic and organic mercury exposures in zebrafish larvae. *ACS Chemical Biology* 7, 411-420.
55. Kusangaya, S., Warburton, M., Archer van Garderen, E., Jewitt, G. (2014). Impacts of climate change on water resources in southern Africa: a review. *Physics and Chemistry of the Earth* 67, 47-54.
56. Langlotz, C. (2003). Fundamental measures of diagnostic examination performance: usefulness for clinical decision making and research. *Radiology* 228, 3-9.
57. Lapenna, D., Cuccurullo, F. (1996). Hypochlorous acid and its pharmacological antagonism: an update picture. *General Pharmacology* 27, 1145-1147.
58. Lazorchak, J., Josephs, J. (2003). A compendium of chemical, physical and biological methods for assessing and monitoring the remediation of contaminated sediment sites (Washington DC, USA: Environmental Protection Agency), pp. 273.
59. LeBlanc, G. (1994). Assessing deleterious ecosystem-level effects of environmental pollutants as a means of avoiding evolutionary consequences. *Environmental Health Perspectives* 102, 266-267.
60. Little, E., Archeski, R., Flerov, B., Kozlovskaya, V. (1990). Behavioral indicators of sublethal toxicity in rainbow trout. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 19, 380-385.
61. Little, E., Finger, S. (1990). Swimming behavior as an indicator of sublethal toxicity in fish. *Environmental Toxicology and Chemistry* 9, 13-19.
62. Liu, Y., Lee, S., Chon, T. (2011). Analysis of behavioral changes of zebrafish (*Danio rerio*) in response to formaldehyde using Self-organizing map and a hidden Markov model. *Ecological Modelling* 222, 2191-2201.
63. Liu, Y., Wu, F., Ji, C., Chon, T. (2012). Movement patterning of *Daphnia magna* treated with copper based on Self-Organizing Map. *Procedia Environmental Sciences* 13, 994-1002.
64. Lopez-Galindo, C., Garrido, M., Casanueva, J., Nebot, E. (2010a). Degradation models and ecotoxicity in marine waters of two antifouling compounds: sodium hypochlorite and an alkylamine surfactant. *The Science of the Total Environment* 408, 1779-1785.

65. Lopez-Galindo, C., Vargas-Chacoff, L., Nebot, E., Casanueva, J., Rubio, D., Sole, M., Mancera, J. (2010b). Biomarker responses in *Solea senegalensis* exposed to sodium hypochlorite used as antifouling. *Chemosphere* 78, 885-893.
66. MacPhail, R., Brooks, J., Hunter, D., Padnos, B., Irons, T., Padilla, S. (2009). Locomotion in larval zebrafish: influence of time of day, lighting and ethanol. *Neurotoxicology* 30, 52-58.
67. Magalhães, D., Cunha, R., Santos, J., Buss, D., Baptista, D. (2007). Behavioral response of zebrafish *Danio rerio* Hamilton 1822 to sublethal stress by sodium hypochlorite: ecotoxicological assay using an image analysis biomonitoring system. *Ecotoxicology* 16, 417-422.
68. Manduzio, H., Monsinjon, T., Galap, C., Leboulenger, F., Rocher, B. (2004). Seasonal variations in antioxidant defences in blue mussels *Mytilus edulis* collected from a polluted area: major contributions in gills of an inducible isoform of Cu/Zn-superoxide dismutase and of glutathione S-transferase. *Aquatic Toxicology* 70, 83-93.
69. Marini, M., Betti, M., Grati, F., Marconi, V., Mastrogiacomo, A., Polidori, P., Sanxhaku, M. (2012). Evaluation of lindane diffusion along the southeastern Adriatic coastal strip (Mediterranean Sea): a case study in an Albanian industrial area. *Marine Pollution Bulletin* 64, 472-478.
70. Martins, J., Oliva Teles, L., Vasconcelos, V. (2007). Assays with *Daphnia magna* and *Danio rerio* as alert systems in aquatic toxicology. *Environment International* 33, 414-425.
71. McAllister, B., Kime, D. (2003). Early life exposure to environmental levels of the aromatase inhibitor tributyltin causes masculinisation and irreversible sperm damage in zebrafish (*Danio rerio*). *Aquatic Toxicology* 65, 309-316.
72. Mohammadi, Z. (2008). Sodium hypochlorite in endodontics: an update review. *International Dental Journal* 58, 329-341.
73. Monarca, S., Feretti, D., Collivignarelli, C., Guzzella, L., Zerbini, I., Bertanza, G., Pedrazzani, R. (2000). The influence of different disinfectants on mutagenicity and toxicity of urban wastewater. *Water Research* 34, 4261-4269.
74. Monarca, S., Zani, C., Richardson, S., Thruston, A., Moretti, M., Feretti, D., Villarini, M. (2004). A new approach to evaluating the toxicity and genotoxicity of disinfected drinking water. *Water Research* 38, 3809-3819.
75. Montiglio, P., Royaute, R. (2014). Contaminants as a neglected source of behavioural variation. *Animal Behaviour* 88, 29-35.
76. Moorman, S. (2001). Development of sensory systems in zebrafish (*Danio rerio*). *ILAR Journal* 42, 292-298.

77. Nebot, E., Casanueva, J., Casanueva, T., Fernandez-Baston, M., Sales, D. (2006). In situ experimental study for the optimization of chlorine dosage in seawater cooling systems. *Applied Thermal Engineering* 26, 1893-1900.
78. Nevado, J. (2003). Distribution of mercury in the aquatic environment at Almadén, Spain. *Environmental Pollution* 122, 261-271.
79. Nolan, K., Kamrath, J., Levitt, J. (2012). Lindane toxicity: a comprehensive review of the medical literature. *Pediatric Dermatology* 29, 141-146.
80. Pannia, E., Tran, S., Rampersad, M., Gerlai, R. (2014). Acute ethanol exposure induces behavioural differences in two zebrafish (*Danio rerio*) strains: a time course analysis. *Behavioural Brain Research* 259, 174-185.
81. Peachey, R. (2003). Tributyltin and polycyclic aromatic hydrocarbon levels in Mobile Bay, Alabama: a review. *Marine Pollution Bulletin* 46, 1365-1371.
82. Pignata, C., Fea, E., Rovere, R., Degan, R., Lorenzi, E., de Ceglia, M., Schiliro, T., Gilli, G. (2012). Chlorination in a wastewater treatment plant: acute toxicity effects of the effluent and of the recipient water body. *Environmental Monitoring and Assessment* 184, 2091-2103.
83. Pitanga, F. (2011). The effect of sodium hypochlorite in different aquatic organisms. *Aquatic Biology (Universidade de Aveiro)*, pp. 58.
84. Pittman, J., Ichikawa, K. (2013). iPhone(R) applications as versatile video tracking tools to analyze behavior in zebrafish (*Danio rerio*). *Pharmacology, Biochemistry and Behavior* 106, 137-142.
85. Poornima, E., Rajadurai, M., Rao, T., Anupkumar, B., Rajamohan, R., Narasimhan, S., Rao, V., Venugopalan, V. (2005). Impact of thermal discharge from a tropical coastal power plant on phytoplankton. *Journal of Thermal Biology* 30, 307-316.
86. Powers, C., Yen, J., Linney, E., Seidler, F., Slotkin, T. (2010). Silver exposure in developing zebrafish (*Danio rerio*): persistent effects on larval behavior and survival. *Neurotoxicology and Teratology* 32, 391-397.
87. Qiao, J., Han, H. (2010). An adaptative fuzzy neural network based on Self-Organizing Map (SOM). *Self-Organizing Maps, (Shanghai, China: InTech)*, pp. 1-14.
88. Richards, F., Alderton, W., Kimber, G., Liu, Z., Strang, I., Redfern, W., Valentin, J., Winter, M., Hutchinson, T. (2008). Validation of the use of zebrafish larvae in visual safety assessment. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods* 58, 50-58.
89. Richetti, S., Rosemberg, D., Ventura-Lima, J., Monserrat, J., Bogo, M., Bonan, C. (2011). Acetylcholinesterase activity and antioxidant capacity of zebrafish brain is altered by heavy metal exposure. *Neurotoxicology* 32, 116-122.

90. Ruiz, J., Bachelet, G., Caumette, P., Donard, O. (1996). Three decades of tributyltin in the coastal environment with emphasis on Arcachon Bay, France. *Environmental Pollution* 93, 195-203.
91. Rumelhart, D., Hinton, G., Williams, R. (1986). Learning representations by backpropagating errors. *Nature* 323, 533-536.
92. Samson, J., Goodridge, R., Olobatuyi, F., Weis, J. (2001). Delayed effects of embryonic exposure of zebrafish (*Danio rerio*) to methylmercury (MeHg). *Aquatic Toxicology* 51, 369-376.
93. Schrandt, M., Hardy, K., Johnson, K., Lema, S. (2012). Physical habitat and social conditions across a coral reef shape spatial patterns of intraspecific behavioral variation in a demersal fish. *Marine Ecology* 33, 149-164.
94. Schreck, C., Olla, B., Davis, M. (1997). Behavioral response to stress. Fish stress and health in aquaculture (Cambridge, UK: Cambridge University Press), 145-170.
95. Scott, G., Sloman, K. (2004). The effects of environmental pollutants on complex fish behaviour: integrating behavioural and physiological indicators of toxicity. *Aquatic Toxicology* 68, 369-392.
96. Scott, G., Sloman, K., Rouleau, C., Wood, C. (2003). Cadmium disrupts behavioural and physiological responses to alarm substance in juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *The Journal of Experimental Biology* 206, 1779-1790.
97. Sharma, S., Coombs, S., Patton, P., Burt de Perera, T. (2009). The function of wall-following behaviors in the Mexican blind cavefish and a sighted relative, the Mexican tetra (*Astyanax*). *Journal of Comparative Physiology* 195, 225-240.
98. Shiklomanov, I. (1998). World water resources: a new appraisal and assessment for the 21st century (Paris, France: UNESCO International Hydrological Programme), pp. 37.
99. Shimasaki, Y., Kitano, T., Oshima, Y., Inoue, S., Imada, N., Honjo, T. (2003). Tributyltin causes masculinization in fish. *Environmental Toxicology and Chemistry* 22, 141-144.
100. Spink, A., Tegelenbosch, R., Buma, M., Noldus, L. (2001). The EthoVision video tracking system - a tool for behavioral phenotyping of transgenic mice. *Physiology & Behavior* 73, 731-744.
101. Sudaryanto, A., Takahashi, S., Monirith, I., Ismail, A., Muchtar, M., Zheng, J., Richardson, B., Subramanian, A., Prudente, M., Hue, N., *et al.* (2002). Asia-Pacific mussel watch: monitoring of butyltin contamination in coastal waters of Asian developing countries. *Environmental Toxicology and Chemistry* 21, 2119-2130.

102. Talley, L., Pickard, G., Emery, W., Swift, J. (2011). Ocean dimensions, shapes, and bottom materials. Descriptive Physical Oceanography (Sixth Edition), (Boston, USA: Academic Press), pp. 7-27.
103. Thresher, R., Gurney, R., Canning, M. (2011). Effects of lifetime chemical inhibition of aromatase on the sexual differentiation, sperm characteristics and fertility of medaka (*Oryzias latipes*) and zebrafish (*Danio rerio*). Aquatic Toxicology 105, 355-360.
104. Tran, S., Gerlai, R. (2014). Recent advances with a novel model organism: Alcohol tolerance and sensitization in zebrafish (*Danio rerio*). Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry 55, 87-93.
105. Uddin, R., Wahid, M., Jasmeen, T., Huda, N., Sutradhar, K. (2011). Detection of formalin in fish samples collected from Dhaka City, Bangladesh. Stamford Journal of Pharmaceutical Sciences 4, 49-52.
106. Vale, C., Damgaard, I., Sunol, C., Rodriguez-Farré, E., Schousboe, A. (1998). Cytotoxic action of lindane in neocortical GABAergic neurons is primarily mediated by interaction with flunitrazepam-sensitive GABAA receptors. Journal of Neuroscience Research 52, 276-285.
107. van der Oost, R., Beyer, J., Vermeulen, N. (2003). Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. Environmental Toxicology and Pharmacology 13, 57-149.
108. Varusai, N., Asrar, S., Sultan, M., Azmathullah, N. (2012). Toxicity of formalin on behaviour and respiration in *Danio rerio*. International Journal of Environmental Sciences 2, 1904- 1908.
109. WHO (1991). Inorganic mercury. International Programme on Chemical Safety, (Geneva, Switzerland: World Health Organization), pp. 133.
110. Winter, M., Redfern, W., Hayfield, A., Owen, S., Valentin, J., Hutchinson, T. (2008). Validation of a larval zebrafish locomotor assay for assessing the seizure liability of early-stage development drugs. Journal of Pharmacological and Toxicological Methods 57, 176-187.
111. Wu, Y., Chen, J. (2013). Investigating the effects of point source and nonpoint source pollution on the water quality of the East River (Dongjiang) in South China. Ecological Indicators 32, 294-304.
112. Yang, R., Zhou, Q., Jiang, G. (2006). Butyltin accumulation in the marine clam *Mya arenaria*: an evaluation of its suitability for monitoring butyltin pollution. Chemosphere 63, 1-8.
113. Zhang, G., Patuwo, B., Hu, M. (1997). Forecasting with artificial neural networks: The state of the art. International Journal of Forecasting 14, 35-62.

114. Zala, S., Penn, D. (2004). Abnormal behaviours induced by chemical pollution: a review of the evidence and new challenges. *Animal Behaviour* 68, 649-664.

7. Anexos

Anexo 1 - Grupos Homogêneos

Tabela 1 - Grupos Homogêneos formados pelo *Tukey Honest Significance Test* referentes ao valor médio da variável coordenada X (mm) nas condições experimentais Controlo (Cont), Lixívia (Líx), Lindano (Lin), TBE, Mercúrio (Mer) e Formol (For). O valor de significância (Sig) é apresentado no final.

Condição Experimental		Coordenada X (mm)					
		1	2	3	4	5	6
Tukey HSD	Líx	71,071256					
	Lin		72,449234				
	Mer			73,93915			
	TBE				75,504401		
	For					80,683377	
	Cont						<u>86,003012</u>
	Sig	1	1	1	1	1	1

Tabela 2 - Grupos Homogêneos formados pelo *Tukey Honest Significance Test* referentes ao valor médio da variável coordenada Y (mm) nas condições experimentais Controlo (Cont), Lixívia (Líx), Lindano (Lin), TBE, Mercúrio (Mer) e Formol (For). O valor de significância (Sig) é apresentado no final.

Condição Experimental		Coordenada Y (mm)			
		1	2	3	4
Tukey HSD	TBE	40,6424128			
	For		42,9820710		
	Cont			45,3827108	
	Mer			45,5377832	
	Lin			45,6345963	
	Líx				47,3461981
	Sig	1	1	0,772	1

Tabela 3 - Grupos Homogêneos formados pelo *Tukey Honest Significance Test* referentes ao valor médio da variável velocidade linear (mm/s) nas condições experimentais Controlo (Cont), Lixívia (Líx), Lindano (Lin), TBE, Mercúrio (Mer) e Formol (For). O valor de significância (Sig) é apresentado no final.

Condição Experimental		Velocidade linear (mm/s)					
		1	2	3	4	5	6
Tukey HSD	Cont	35,241510					
	For		36,464941				
	TBE			42,687669			
	Lind				46,116233		
	Mer					48,282016	
	Líx						51,632096
	Sig	1	1	1	1	1	1

Tabela 4 - Grupos Homogêneos formados pelo *Tukey Honest Significance Test* referentes ao valor médio da variável velocidade angular (graus/s) nas condições experimentais Controlo (Cont), Lixívia (Líx), Lindano (Lin), TBE, Mercúrio (Mer) e Formol (For). O valor de significância (Sig) é apresentado no final.

Condição Experimental		Velocidade angular (graus/s)			
		1	2	3	4
Tukey HSD	Lin	200,636670			
	For	201,478349			
	TBE		213,454539		
	Cont			220,772742	
	Líx			221,743596	
	Mer				237,052728
	Sig	0,991	1	0,982	1

Tabela 5 - Grupos Homogêneos formados pelo *Tukey Honest Significance Test* referentes ao valor médio da variável aceleração linear (mm/s²) nas condições experimentais Controlo (Cont), Lixívia (Líx), Lindano (Lin), TBE, Mercúrio (Mer) e Formol (For). O valor de significância (Sig) é apresentado no final.

Condição Experimental		Aceleração linear (mm/s ²)				
		1	2	3	4	5
Tukey HSD	Cont	101,899403				
	For	103,368903				
	TBE		124,090650			
	Lind			136,199818		
	Mer				142,984450	
	Líx					147,410923
	Sig	0,715	1	1	1	1

Tabela 6 - Grupos Homogêneos formados pelo *Tukey Honest Significance Test* referentes ao valor médio da variável aceleração angular (graus/s²) nas condições experimentais Controlo (Cont), Lixívia (Líx), Lindano (Lin), TBE, Mercúrio (Mer) e Formol (For). O valor de significância (Sig) é apresentado no final.

Condição Experimental		Aceleração angular (graus/s ²)					
		1	2	3	4	5	6
Tukey HSD	For	1004,62122					
	Cont		1024,20960				
	Lin			1048,36381			
	TBE				1094,35997		
	Líx					1155,19773	
	Mer						1232,58893
	Sig	1	1	1	1	1	1

Tabela 7 - Grupos Homogêneos formados pelo *Tukey Honest Significance Test* referentes ao valor médio da variável dispersão (raiz quadrada do produto dos desvios padrão X Y) nas condições experimentais Controlo (Cont), Lixívia (Líx), Lindano (Lin), TBE, Mercúrio (Mer) e Formol (For). O valor de significância (Sig) é apresentado no final.

Condição Experimental		Dispersão (raiz quadrada do produto do desvio padrão X Y)			
		1	2	3	4
Tukey HSD	For	13,7984115			
	Cont		15,6432001		
	TBE		15,6745600		
	Lin			17,0537014	
	Líx			17,1861337	
	Mer				17,5898498
	Sig	1	1	0,852	1

Tabela 8 - Grupos Homogêneos formados pelo *Tukey Honest Significance Test* referentes ao valor médio da variável ângulo entre os segmentos formados pelas coordenadas do peixe em três frames sucessivos nas condições experimentais Controlo (Cont), Lixívia (Líx), Lindano (Lin), TBE, Mercúrio (Mer) e Formol (For). O valor de significância (Sig) é apresentado no final.

Condição Experimental		Ângulo entre os segmentos formados pelas coordenadas do peixe em três frames sucessivos			
		1	2	3	4
Tukey HSD	Cont	-1,280768			
	TBE	-1,208043			
	Líx		-0,138937		
	For		-0,080667		
	Lin			0,466163	
	Mer				2,904358
	Sig	0,997	0,999	1	1

Tabela 9 - Grupos Homogêneos formados pelo *Turkey Honest Significance Test* referentes ao valor médio da variável *meander* absoluto nas condições experimentais Controlo (Cont), Lixívia (Líx), Lindano (Lin), TBE, Mercúrio (Mer) e Formol (For). O valor de significância (Sig) é apresentado no final.

Condição		<i>Meander</i> absoluto		
		1	2	3
Tukey HSD	Lin	16,084667		
	Líx	16,660157		
	Mer	17,146370		
	TBE		22,064701	
	For		22,337084	
	Cont			30,689888
	Sig	0,277	0,994	0,982

Anexo 2 - *Statistica Breakdown Table of Descriptive Statistics*

Tabela 1 - *Statistica Breakdown Table of Descriptive Statistics*: Resumo descritivo das nove categorias criadas pela *Cluster Analysis*, nomeadamente o valor médio e desvio padrão, das variáveis coordenada X (mm), coordenada Y (mm) e velocidade linear (mm/s).

Categoria	X Média	X Desvio Padrão	Y Média	Y Desvio Padrão	Velocidade linear Média	Velocidade linear Desvio Padrão
(2, 3)	63,50	17,58	35,74	10,56	73,63	21,97
(1, 2)	88,07	15,32	49,48	10,10	46,17	18,13
(3, 3)	71,30	12,31	39,98	7,64	44,83	12,20
(1, 1)	33,42	14,55	68,84	7,86	48,21	17,04
(2, 1)	94,14	18,43	67,87	7,03	58,92	27,69
(2, 2)	115,32	18,06	36,17	11,20	54,10	28,10
(1, 3)	32,77	15,83	26,49	9,82	60,10	25,81
(3, 2)	78,62	39,32	42,99	20,81	2,06	4,17
(3, 1)	100,21	17,10	49,63	13,78	4,98	6,30

Tabela 2 - *Statistica Breakdown Table of Descriptive Statistics*: Resumo descritivo das nove categorias criadas pela *Cluster Analysis*, nomeadamente o valor médio e desvio padrão, das variáveis aceleração linear (mm/s²), velocidade angular (graus/s) e aceleração angular (graus/s²).

Categoria	Aceleração linear Média	Aceleração linear Desvio Padrão	Velocidade angular Média	Velocidade angular Desvio Padrão	Aceleração angular Média	Aceleração angular Desvio Padrão
(2, 3)	208,29	75,45	73,63	21,97	1202,89	245,53
(1, 2)	130,85	55,01	46,17	18,13	1121,62	246,15
(3, 3)	120,02	36,11	44,83	12,20	616,70	175,48
(1, 1)	156,24	59,76	48,21	17,04	1785,17	264,29
(2, 1)	188,07	92,42	58,92	27,69	1797,88	258,17
(2, 2)	167,05	90,92	54,10	28,10	1708,71	293,70
(1, 3)	194,99	91,26	60,10	25,81	1633,48	268,57
(3, 2)	8,29	12,47	2,06	4,17	372,67	272,48
(3, 1)	18,06	21,30	4,98	6,30	1464,11	391,15

Tabela 3 - *Statistica Breakdown Table of Descriptive Statistics*: Resumo descritivo das nove categorias criadas pela *Cluster Analysis*, nomeadamente o valor médio e desvio padrão, das variáveis dispersão (raiz quadrada do produto dos desvios padrão X Y), ângulo entre os segmentos formados pelas coordenadas do peixe em três frames sucessivos e *meander* absoluto (graus/mm).

Categoria	Dispersão Média	Dispersão Desvio Padrão	Ângulo Média	Ângulo Desvio Padrão	Meander Média	Meander Desvio Padrão
(2, 3)	25,25	4,33	-0,36	11,44	3,13	5,34
(1, 2)	17,73	4,69	0,84	10,49	13,20	18,31
(3, 3)	22,75	4,18	0,31	8,73	2,11	3,41
(1, 1)	10,61	5,34	-1,89	21,29	9,88	19,02
(2, 1)	11,57	4,24	3,11	19,62	8,81	15,73
(2, 2)	12,09	4,62	-1,77	16,28	14,69	23,41
(1, 3)	16,57	5,22	-0,94	12,10	9,38	16,11
(3, 2)	1,11	2,54	-0,17	9,08	53,79	40,76
(3, 1)	100,21	17,10	49,63	13,78	4,98	6,30